

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below:

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application No. PCT/JP00/01070 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date: August 1, 2001

Full name of the translator Tadaaki Nomura

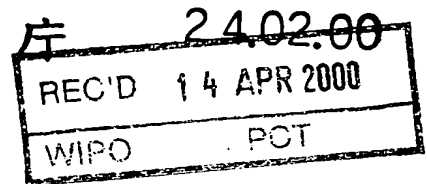
Signature of the translator Tadaaki Nomura

Post Office Address c/o Techlex Co., Ltd., 7-6, Koishikawa  
1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0002 Japan



Table 1. *Continued*

日 本 国 特 許  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1 9 9 9 年 2 月 2 5 日

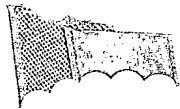
出 願 番 号  
Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 0 4 7 5 7 1 号

出 願 人  
Applicant (s):

協和醗酵工業株式会社

09/914152



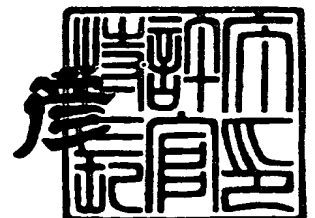
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 0 年 3 月 3 1 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 2 1 2 3 1

【書類名】 特許願  
【整理番号】 H10-2031N2  
【提出日】 平成11年 2月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/54  
【発明者】

【住所又は居所】 東京都東大和市向原 5 - 1 0 8 2 - 1

【氏名】 成松 久

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市旭区二俣川 2 - 3 2

【氏名】 一色 聡一郎

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東久留米市下里 1 - 1 1 - 4 2

【氏名】 樽谷内 晶

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 佐々木 克敏

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞に存在する、シアリルルイス a 糖鎖の合成に関与する  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項2】 以下の (a)、(b) および (c) から選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 31～310 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) (a) または (b) のポリペプチドの有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を合成可能な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド

【請求項3】  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在する N-アセチルグルコサミン残基に  $\beta$  1, 3 結合でガラクトースを転移する活性である、請求項 1 または 2 記載のポリペプチド。

【請求項4】  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc の非還元末端に存在する N-アセチルグルコサミン残基、または N-アセチルグルコサミン単糖に  $\beta$  1, 3 結合でガラクトースを転移する活性である、請求項 1 または 2 記載のポリペプチド。

【請求項5】 以下の (a)、(b)、(c) および (d) から選ばれる DNA。

(a) 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列の 402～1331 番目の塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 2 で表される塩基配列の 492～1331 番目の塩基配列を有する DNA

(d) (a) ~ (c) いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA

【請求項6】 請求項5記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項7】 組換え体DNAが、プラスミドpAM $\phi$ -3GT5またはプラスミドpBS-3GT5 (FERM BP-6645) である、請求項6記載の組換え体DNA。

【請求項8】 請求項5に記載のDNA、請求項6記載の組換え体DNA、または請求項7記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

【請求項9】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物から選ばれる形質転換体である、請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、請求項9記載の形質転換体。

【請求項11】 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、請求項9記載の形質転換体。

【請求項12】 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、請求項9記載の形質転換体。

【請求項13】 請求項1~4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項14】 請求項1~4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該

動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 15】 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 14 記載の製造法。

【請求項 16】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 17】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA を用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 18】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、

ii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の N-アセチルグルコサミンまたは N-アセチルグルコサミン残基に  $\beta$  1, 3 結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

【請求項 19】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) グルコース、

ii) グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) グルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受



容基質、および

(c) ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

【請求項20】 請求項9記載の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

【請求項21】 請求項9記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

【請求項22】 請求項9記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

【請求項23】 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項18～22のいずれかに記載の製造法。

【請求項24】 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項21記載の製造法。

【請求項25】 請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチドをコードす

るDNAまたは該DNAの断片を用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【請求項26】 請求項5に記載のDNAまたは配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるDNA。

【請求項27】 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、請求項26記載のDNA。

【請求項28】 配列番号20または21で表される塩基配列を有するDNA。

【請求項29】 請求項26～28のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【請求項30】 請求項25または29記載の方法を用いた癌または癌転移の検出法。

【請求項 3 1】 請求項 5、26～28 記載の DNA および配列番号 2 または 3 で表される塩基配列を有する DNA から得られる DNA を用い、請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA の転写または mRNA の翻訳を抑制する方法。

【請求項 3 2】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項 3 3】 請求項 3 2 記載の抗体を用いる、請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項 3 4】 請求項 3 2 記載の抗体を用い、請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

【請求項 3 5】 請求項 3 2 記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【請求項 3 6】 請求項 3 2 記載の抗体を含有する、癌または癌転移の診断薬。

【請求項 3 7】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 3 8】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗シアリルルイス a 抗体、抗ルイス a 抗体、抗ルイス b 抗体または抗シアリルルイス c 抗体を用い、シアリルルイス a 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 3 9】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項 3 2 記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 4 0】 請求項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーター DNA。

【請求項 4 1】 プロモーター DNA が、小腸細胞、大腸細胞、脾臓細胞、

胃細胞、大腸癌細胞、膵癌細胞および胃癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、請求項40記載のプロモーターDNA。

【請求項42】 プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、請求項40または41記載のプロモーターDNA。

【請求項43】 プロモーターDNAが、配列番号3で表される塩基配列の1～5000番目の塩基配列中の連続する50～5000bpのDNA配列を有する、請求項40～42のいずれかに記載のプロモーターDNA。

【請求項44】 請求項40～43のいずれかに記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含むプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物の含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項45】 レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、請求項44記載のスクリーニング法。

【請求項46】 請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト動物。

【請求項47】 ノックアウト動物がマウスである、請求項46記載のノックアウト動物。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、シアリルルイスa糖鎖を発現している大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与する $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドを用いたタイプ1糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を

含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたタイプ1糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

糖鎖は、発生・分化、細胞認識といった生命現象に関与しているほか、炎症、癌、感染症、自己免疫疾患、およびその他多くの病気の発生、進行に深く関係していると考えられている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，グリコバイオロジーシリーズ①～⑥，講談社，（1993年）、Glycobiology, 3, 97 (1993)〕。

#### 【0003】

糖鎖は、タンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質、プロテオグリカン、または糖脂質として存在するほか、オリゴ糖としても存在する。

Gal  $\beta$  1-3GlcNAc構造を有する糖鎖はタイプ1糖鎖と呼ばれ、ルイス式血液型抗原や癌関連糖鎖抗原の骨格糖鎖を構成している。ルイス式血液型抗原としては、ルイス a 糖鎖 (Gal  $\beta$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-4)GlcNAc) およびルイス b 糖鎖 [Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\beta$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-4)GlcNAc] が存在する。シアリルルイス a 糖鎖 [NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-4)GlcNAc] およびシアリルルイス c 糖鎖 (NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3GlcNAc) は、主に大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌において高頻度に検出される癌関連糖鎖であり、シアリルルイス a 糖鎖およびシアリルルイス c 糖鎖に対する抗体は癌の血清診断に利用されている。

#### 【0004】

白血球の炎症部位への集積やリンパ球のリンパ節へのホーミングには、接着分子セレクトリン (E-、P-、およびL-セレクトリン) とその糖鎖リガンド (シアリルルイス x 糖鎖またはその関連糖鎖) の接着が関与していることが明らかとなっている。

#### 【0005】

シアリルルイス x 糖鎖 [NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4(Fuc  $\alpha$  1-3)GlcNAc] の構造異性体であるシアリルルイス a 糖鎖はセレクトリンと結合することから、シアリルルイス a 糖鎖は癌の転移に関与すると考えられている。また、大腸癌や膵臓癌におけるシアリルルイス a 糖鎖の発現量が、癌の予後の悪さと相関しているという報告も

ある。

【0006】

Gal $\beta$ 1-3GlcNAc構造は、GlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素によって合成される。これまでに3種類のGlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2、 $\beta$ 3Gal-T3) の遺伝子がクローン化され、それぞれの酵素の受容基質特異性が解析されている〔特開平6-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)〕。また、基質特異性の異なる別の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 3Gal-T4) の遺伝子がクローン化されている〔J. Biol. Chem. 272, 24794-24799 (1997)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)〕。 $\beta$ 3Gal-T4はガングリオシドGA1、GM1またはGD1bを合成するが、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc構造は合成しない。

【0007】

大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌において、癌関連糖鎖であるシアリルルイスa糖鎖およびシアリルルイスc糖鎖の合成に関与するGlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素が同定できれば、該酵素または該酵素遺伝子の発現量を調べることで、より正確な癌の診断が可能になると推定される。また、該酵素活性、または該酵素遺伝子の転写・翻訳を抑制することにより、癌転移の抑制が可能になると期待される。しかし、これまでに該酵素または該酵素遺伝子は同定されていない。大腸癌細胞株Colo205からGlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素が部分精製されているが、該酵素の単離、該酵素のアミノ酸配列の決定、ならびに該酵素遺伝子の単離には至っていない〔J. Biol. Chem. 262, 15649-15658 (1987)、Archi. Biochem. Biophys. 270, 630-646 (1989)、Archi. Biochem. Biophys. 274, 14-25 (1989)〕。

【0008】

セレクチンに強い結合能を有する糖鎖は、セレクチンアンタゴニストとして、炎症や癌転移の治療および予防に有用である。従って、大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌においてシアリルルイスa糖鎖の合成に関与している $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素は、セレクチンアンタゴニストの効率的合成にも利用可能と推定

される。

【0009】

ヒトの乳中には、様々なオリゴ糖が存在することが知られている [Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)]。ラクトーN-テトラオース ( $\text{Gal} \beta 1-3\text{GlcNAc} \beta 1-3\text{GlcNAc} \beta 1-4\text{Glc}$ ) は、ヒト乳中に多く含まれ、乳児がウイルスや微生物に感染するのを防いでいると考えられている。また、ラクトーN-テトラオースには良性の腸内細菌であるビフィズス菌の増殖を促す活性もある。一方、ウシやマウス等の動物の乳中に存在するオリゴ糖の種類は少なく、大部分がラクトースであり3糖以上のオリゴ糖はほとんど存在しない [Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)、J. Biol. Chem., 270, 29515 (1995)]。

【0010】

ラクトーN-テトラオースを母核とする様々なオリゴ糖、あるいはそれらが含まれたミルクを効率よく生産することができれば、産業上非常に有用と思われる。したがって、これまでにクローン化された  $\text{GlcNAc} \beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素に比較して、よりラクトーN-テトラオースを合成する活性の高い酵素の開発は産業上重要な課題である。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、または癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の改善法、および癌等の疾患の診断法を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の (1) ~ (47) に関する。

(1) シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞に存在する、シアリルルイス a 糖鎖の合成に関与する  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

【0013】

上記本発明の新規  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド

は、シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞のみならずシアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖等のタイプ1糖鎖を発現している大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞にも存在し、これら消化器系癌細胞に存在するタイプ1糖鎖の効率的合成に関与する  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドである。本発明のポリペプチドは、公知の  $\beta$  3 Gal-T1、 $\beta$  3 Gal-T2 および  $\beta$  3 Gal-T3 とは異なる新規な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素である。

【0014】

(2) 以下の (a)、(b) および (c) から選ばれるポリペプチド：

(a) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 31～310 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

(c) (a) または (b) のポリペプチドの有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を合成可能な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

【0015】

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1 若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0016】

かかる 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ新規  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント 1～38 と略記する)、Nucleic Acids Re



search, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0017】

上記の (a) または (b) のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつGal  $\beta$  1-3GlcNAc構造を合成可能な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、公知の  $\beta$  3 Gal-T1、 $\beta$  3 Gal-T2および  $\beta$  3 Gal-T3とは異なる新規な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素である。

【0018】

(3)  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基に  $\beta$  1, 3結合でガラクトースを転移する活性である上記 (1) または (2) 記載のポリペプチド。

(4)  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glcの非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基、またはN-アセチルグルコサミン単糖に  $\beta$  1, 3結合でガラクトースを転移する活性である、上記 (1) または (2) 記載のポリペプチド。

【0019】

(5) 以下の (a)、(b)、(c) および (d) から選ばれるDNA:

(a) 請求項1~4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA、

(b) 配列番号2で表される塩基配列の402~1331番目の塩基配列を有するDNA、

(c) 配列番号2で表される塩基配列の492~1331番目の塩基配列を有するDNA、および

(d) (a) ~ (c) いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつGal  $\beta$  1-3GlcNAc構造を合成可能な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

## 【0020】

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記 (a)、(b) および (c) のDNAから選ばれるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

## 【0021】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

## 【0022】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。該DNAのコードするGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、公知の $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2 および $\beta$ 3Gal-T3とは異なる新規な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素である。

## 【0023】

(6) 上記(5)記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(7) 組換え体DNAが、プラスミドpAMo-3GT5またはプラスミドpBS-3GT5(FERM BP-6645)である、上記(6)記載の組換え体DNA。

【0024】

(8) 上記(5)に記載のDNA、(6)記載の組換え体DNA、または(7)記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(9) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物から選ばれる形質転換体である、上記(8)記載の形質転換体。

【0025】

(10) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(9)記載の形質転換体。

(11) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、上記(9)記載の形質転換体。

【0026】

(12) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、上記(9)記載の形質転換体。

(13) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0027】

(14) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0028】

(15) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(14)記載の製造法。

(16) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0029】

(17) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(18) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、

ii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

【0030】

(19) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) グルコース、

ii) グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) グルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

【0031】

(20) 上記(9)記載の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

【0032】

(21) 上記(9)記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

【0033】

(22) 上記(9)記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

【0034】

(23) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、上記(18)～(22)のいずれかに記載の

製造法。

【0035】

(24) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(21)記載の製造法。

(25) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【0036】

(26) 上記(5)に記載のDNAまたは配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるDNA。

【0037】

(27) 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、上記(26)記載のオリゴヌクレオチド。

【0038】

- (28) 配列番号 20 または 21 で表される塩基配列を有する DNA。
- (29) 上記 (26) ～ (28) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。
- (30) 上記 (25) または (29) 記載の方法を用いた癌または癌転移の検出法。

【0039】

- (31) 上記 (5)、(26) ～ (28) 記載の DNA および配列番号 2 または 3 で表される塩基配列を有する DNA から得られる DNA を用い、上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA の転写または mRNA の翻訳を抑制する方法。

【0040】

- (32) 上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のポリペプチドを認識する抗体。
- (33) 上記 (32) 記載の抗体を用いる、上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【0041】

- (34) 上記 (32) 記載の抗体を用い、上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。
- (35) 上記 (32) 記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。
- (36) 上記 (32) 記載の抗体を含有する、癌または癌転移の診断薬。

【0042】

- (37) 上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0043】

- (38) 上記 (1) ～ (4) のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗シアリルルイス a 抗体、抗ルイス a 抗体、抗ルイス b

抗体または抗シアリルルイス c 抗体を用い、シアリルルイス a 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0044】

(39) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(32)記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0045】

(40) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(41) プロモーターDNAが、小腸細胞、大腸細胞、脾臓細胞、胃細胞、大腸癌細胞、脾癌細胞および胃癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、上記(40)記載のプロモーターDNA。

【0046】

(42) プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、上記(40)または(41)記載のプロモーターDNA。

(43) プロモーターDNAが配列番号3で表される塩基配列の1～5000番目の塩基配列中の連続する50～5000bpのDNA配列を有する、上記(40)～(42)のいずれかに記載のプロモーターDNA。

【0047】

(44) 上記(40)～(43)のいずれかに記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0048】

(45) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェ



ラーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、上記(44)記載のスクリーニング法。

【0049】

(46) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト動物。

(47) ノックアウト動物がマウスである、上記(46)記載のノックアウト動物。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0050】

【発明の実施の形態】

(1) 本発明のシアリルルイスa糖鎖等のタイプ1糖鎖を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチドをコードするDNA(以下、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子と略すこともある)の取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖を発現している、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞より、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

【0051】

cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント1～38、A Laboratory Manual, 2nd Ed.(1989)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等があげられる。

【0052】

シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖を発現している大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞としては、例えば、シアリルルイス a 糖鎖を発現しているヒト大腸癌細胞株である Colo205、Colo201、SW1116 等、あるいはシアリルルイス a 糖鎖を発現しているヒト膵臓癌細胞株である Capan-2 等を用いることができる。

【0053】

cDNA ライブラリーを作製するための、クローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] 等をあげることができる。

【0054】

宿主微生物としては、大腸菌 *Escherichia coli* に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、*Escherichia coli* C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、*Escherichia coli* Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、*Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、*Escherichia coli* JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、*Escherichia coli* SOLR<sup>TM</sup> Strain [ストラタジーン社より市販]、*E. coli* LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等を用いることができる。

【0055】

cDNAライブラリーとして、例えば、以下のようにして作製したcDNAライブラリーをあげることができる。

ヒト大腸癌細胞株Colo205由来のmRNAよりGIBCO BRL社製のcDNA合成システム(cDNA Synthesis System)キットを用いてcDNAを合成する。

【0056】

該DNAの両末端にSfiIリンカーを付与した後、クローニングベクターpAMoのSfiI部位に挿入したプラスミドを作製する。

該プラスミドを用い、*E. coli* LE392を形質転換してcDNAライブラリーを作製する。

【0057】

作製したcDNAライブラリーより目的とするDNAを含むクローンを以下の方法で選択する。

上記で作製したcDNAライブラリーから、常法あるいはキアジェン(Qiagen)社製のプラスミド調製キットである/plasmid/maxi kit(商品番号41031)等のキットを用いてプラスミドを調製する。

【0058】

既知の4種の $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列を比較することにより、4種の $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素でアミノ酸配列がよく保存されている領域を2ヶ所以上見出す。

公知の方法[Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler, "PCR Primer: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab.(1995)、井上純一郎・仙波憲太郎編、ザ・プロトコールシリーズ「cDNAクローニング」, 羊土社, (1996年)、Science, 241, 42 (1988)]に従って各領域のアミノ酸配列に対応するDNA配列を有するdegenerateプライマーを設計し、上記で調製したcDNAライブラリーを鋳型としてポリメラーゼ・チェーン・リアクション(Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと略記する)[モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press (1990)]を行い、増幅断片を適当なプラスミドにサブクローニングする。

【0059】

PCR増幅断片のサブクローニングは、増幅DNA断片をそのまま、あるいは制限酵素やDNAポリメラーゼで処理後、常法によりベクターに組み込むことにより行うことができる。

ベクターとしては、pBluescript II SK(+)、pBluescript SK(-) (いずれもStratagene社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+) [Stratagene社製、Strategies, 5, 6264 (1992)]、pT7Blue [Novagen社製]、pCR II [インビトロジェン社製、Biotechnology, 9, 657 (1991)]、pCR-TRAP [Genhunter社製]、pNoTA<sub>T7</sub> (5' → 3' 社製) 等をあげることができる。

#### 【0060】

サブクローン化されたPCR増幅断片の塩基配列を決定することにより、既知のβ1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を選択する。塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは373A・DNAシーケンサー [Perkin Elmer社製] 等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

#### 【0061】

上記で作製したcDNAライブラリーに対して、該DNA断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより、既知のβ1, 3-ガラクトース転移酵素とホモロジーを有するポリペプチドをコードするcDNAを取得することができる。プローブとしては、該DNA断片をアイソトープあるいはジゴキシゲニン (digoxigenin) 標識したものを使用することができる。

#### 【0062】

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (197

7))あるいは373A・DNAシーケンサー〔パーキン・エルマー (Perkin Elmer) 社製〕等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

【0063】

該方法により取得されるDNAとして、例えば、配列番号1で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号2のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、後述の実施例に記載したpAMo-3GT5、pBS-3GT5 (FERM BP-6645) をあげることができる。

【0064】

上記のようにして取得したDNAを発現ベクターに組み込み発現プラスミドを構築する。得られた発現プラスミドを適当な動物細胞に導入後、抗シアリルルイスa糖鎖抗体または抗シアリルルイスc糖鎖抗体を用いたフルオレッセンス・アクティベータッド・セル・ソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter; 以下、FACSと略記する) 解析により、該DNAがシアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖の合成に関与する $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素をコードするかどうかを調べることができる。

【0065】

該発現ベクターとしては、該cDNAを組み込んで動物細胞で発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができ、例えば、pcDNA1/Amp、pcDNA1、pcDM8 (いずれもフナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRSA (特開平05-336963)]、pAS3-3 (特開平2-227075) 等を用いることができる。

【0066】

cDNAを組み込んだ発現ベクターを、目的とするcDNAを選択可能な動物細胞に導入し、形質転換細胞を取得する。

該発現ベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等の方法をあげることができる。

【0067】

動物細胞としては、ヒトの細胞であるNamalwa細胞、Namalwa細胞のサブラインであるNamalwa KJM-1細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、大腸癌細胞株であるHCT-15等をあげることができ、好ましくは、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞またはHCT-15をあげることができる。

【0068】

得られた形質転換細胞を常法により培養する。

具体的には、以下の形質転換体の培養方法をあげることができる。

形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0069】

培養は、通常 pH 6~8、25~40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1~7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0070】

該培養により得られた細胞を、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体または抗シアリルルイス c 糖鎖抗体を用いて蛍光染色した後、FACSを用いて解析することにより、該発現プラスミドを導入した細胞においてシアリルルイス a 糖鎖またはシアリル

ルイス c 糖鎖量が増加するかどうか検討する。シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖量が増加していれば、該 DNA はシアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖の合成に関与する新規  $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素をコードしていると考えることができる。

## 【0071】

シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖と反応する抗体であればいかなるものでも、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体または抗シアリルルイス c 糖鎖抗体として用いることができ、例えば、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体である 19-9 (Fujirebio 社製) や KM231 (Kyowa Medex 社製)、あるいは抗シアリルルイス c 糖鎖抗体である DU-PAN-2 (Kyowa Medex 社製) をあげることができる。

## 【0072】

以上のようにして、大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイス a 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖に属する癌関連糖鎖の合成に関与する、 $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチドをコードする DNA を取得することができる。

## 【0073】

また、上記方法で取得した DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を選択することにより、配列番号 1 記載のアミノ酸配列と比較して、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする目的の DNA を取得することができる。

## 【0074】

即ち、非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ウシ、サル等由来の cDNA ライブラリーに対してスクリーニングを行うことにより、目的の DNA を取得することができる。

決定された新規  $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードする DNA を化学合成することによっても目的の DNA を調製することができる。DNA の化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製の DNA 合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製の DNA 合成機 model 392 等を用いて行うこと

ができる。

【0075】

また、後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、PCRを行うことによって、目的とするDNAを調製することができる。

【0076】

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法、あるいはDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0077】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2または3で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度( $T_m$ )および塩基数が極端に変わることのない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には、配列番号20、21等に表示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

【0078】

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、誘導体オリゴヌクレオチドという）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

【0079】

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'—P5'ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボ



ースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

## 【0080】

(2) 新規β1, 3-ガラクトース転移酵素ポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドともいう）の製造

本発明のポリペプチドは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1～38等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、製造することができる。

## 【0081】

本発明のポリペプチドをコードする全長DNAを基にして、必要に応じて、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

また、該ポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換したDNAを調製する。該DNAは該ポリペプチドの生産率を向上させるうえで有用である。

## 【0082】

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNA（組換えベクター）を作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

【 0 0 8 3 】

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、新規  $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【 0 0 8 4 】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、新規  $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子の発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規  $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【 0 0 8 5 】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社）、pSE280（インビトロジェン社）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社製〕、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK+（ストラタジーン社製）、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pTrs30（FERM BP-5407）、pTrs32(FERM BP-5408)、pGHA2(FERM BP-400)、pGKA2(FERM B-6798)、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)〕、pGEX（ファルマシア社製）、pETシステム（ノバジェン社製）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社製）、pMAL-c2（New England Biolabs社製）、pUC19〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pSTV28（宝酒造社製）、pUC118（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）等を例示することができる。

【 0 0 8 6 】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター ( $P_{trp}$ )、lacプロモーター ( $P_{lac}$ )、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、 $P_{SE}$ プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、 $SPO1$ プロモーター、 $SPO2$ プロモーター、 $penP$ プロモーター等をあげることができる。また  $P_{trp}$  を2つ直列させたプロモーター ( $P_{trp} \times 2$ )、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0087】

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0088】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY 3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Escherichia coli BL21(DE3)、Escherichia coli BL21(DE3)pLysS、Escherichia coli HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3)pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354、Pseudo

monas sp. D-0110等をあげることができる。

【0089】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0090】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0091】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163(1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【 0 0 9 2 】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNAI/Amp、p cDNAI、p CDM8（いずれもフナコシ社より市販）、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pREP4（インビトロジェン社製）、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAMo、pAMoA〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名 p A M o P R S A（特開平05-336963）〕、pAS3-3（特開平2-227075）等を例示することができる。

【 0 0 9 3 】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ヒトCMV）のI E（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス（Moloney Murine Leukemia Virus）のロング・ターミナル・リピート・プロモーター（Long Terminal Repeat Promoter）、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのI E遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【 0 0 9 4 】

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト大腸癌細胞株等をあげることができる。

【 0 0 9 5 】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等をあげることができる。

【 0 0 9 6 】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれ

はいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

【0097】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント 1~38 (Current Protocols in Molecular Biology)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0098】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (すべてインビトロジェン社製)等をあげることができる。

【0099】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0100】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplu

sia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

【0 1 0 1】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

【0 1 0 2】

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

【0 1 0 3】

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法〔組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)〕に準じてポリペプチドを生産することができる。

発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

【0 1 0 4】

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

【0 1 0 5】

宿主細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、ニンジン、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等

をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

#### 【0106】

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。

培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

#### 【0107】

培養は、通常 pH 5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

#### 【0108】

動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

#### 【0109】

プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。



## 【0110】

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

## 【0111】

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

## 【0112】

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

## 【0113】

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。

## 【0114】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

## 【0115】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の

方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0116】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。

【0117】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0118】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。

【0119】

培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。

培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0120】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換し

た微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0 1 2 1】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0 1 2 2】

培養は、通常pH 6～8、25～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0 1 2 3】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が昆虫細胞である場合、該細胞を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（ファーマンジェン社製）、Sf-900 II SFM培地（ギブコBRL社製）、ExCell 400、ExCell 405 [いずれもJRHバイオサイエンス社製]、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0 1 2 4】

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

遺伝子の発現方法としては、ポリペプチド全長を発現させる以外に、β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する領域を含む部分ポリペプチドとして発現さ

せることもできる。糖転移酵素は、一般にタイプ2型の膜タンパク質のトポロジーを有し、N末端の数から数十アミノ酸からなる細胞質領域、疎水性の高いアミノ酸配列を有する膜結合領域、数から数十アミノ酸からなる幹領域 (stem region)、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなっている。幹領域と触媒領域を含む残りの大半のC末端部分は、ゴルジ体内腔に露出していると考えられる。幹領域と触媒領域の境界は、N末端を欠失させたポリペプチドを作製し、どこまで欠失させると活性がなくなるかを検討することにより、実験的に求めることができる。一方、幹領域と触媒領域に関する知見のある類似の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較することにより、幹領域と触媒領域を予想することもできる。

#### 【0125】

本発明の新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素の構造も、他の糖転移酵素と同様の構造を有している。

例えば、配列番号1で示されたアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドの場合、N末端の7アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも4アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなる。他の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも4アミノ酸からなると予想される。従って、31番目から310番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

#### 【0126】

上記のポリペプチド全長または $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する領域 (触媒領域) を含む部分ポリペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トラン

スフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、S ペプチド、DNA 結合タンパク質ドメイン、Tac 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープ等があげられる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474 (1995)〕。

## 【0127】

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

## 【0128】

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264，17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86，8227 (1989)、Genes Develop., 4，1288 (1990)〕、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

## 【0129】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

## 【0130】

具体的には、触媒部位を含むと考えられる31番目から310番目までのアミノ酸配列を有するポリペプチドの手前に、シグナルペプチドを付加して発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができると考えられる。さらに、シグナルペプチドと触媒領域を含むポリペプチドの間、または触媒領域を含むポリペプチドのC末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。精製・検出用のタグとしては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルト

ース結合タンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、S ペプチド、DNA 結合タンパク質ドメイン、T a c 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープ等があげられる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474 (1995)〕。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

#### 【0131】

本発明ポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。

例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

#### 【0132】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0133】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペ

プチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0 1 3 4】

細胞外に該ポリペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0 1 3 5】

また、通常の糖転移酵素の精製方法 [J. Evan. Sadler ら：メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 83, 458] に準じて精製できる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる [山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)]。

【0 1 3 6】

例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテイン A との融合タンパク質として生産し、イムノグロブリン G を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0 1 3 7】

また、本発明のポリペプチドを FLAG ペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗 FLAG 抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。

【0 1 3 8】

更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

本発明のポリペプチドは、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129-134, Science, 242, 1162-1164, J. Biochem., 110, 166-168 (1991)〕に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて生産することができる。

## 【0139】

上記で取得されたポリペプチドのアミノ酸情報を基に、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても本発明のポリペプチドを製造することができる。また、アドバンスト・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテク社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

## 【0140】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

本発明のポリペプチドの $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性は、公知の測定法〔J. Biol. Chem. 258, 9893-9898 (1983)、J. Biol. Chem. 262, 15649-15658 (1987)、Archi. Biochem. Biophys. 270, 630-646 (1989)、Archi. Biochem. Biophys. 274, 14-25 (1989)、特開平06-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)〕に準じて測定することができる。

## 【0141】

(3) ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造

上記(2)で取得した微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基



、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することにより、該糖鎖または該複合糖質を製造することができる。

## 【0142】

ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン残基に付加した構造を含有する糖鎖として、シアリルルイス a 構造を含有する糖鎖、シアリルルイス c 構造を含有する糖鎖、ルイス a 構造を含有する糖鎖、ルイス b 構造を含有する糖鎖、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を含有する糖鎖、Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を含有する糖鎖、GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を含有する糖鎖等をあげることができる。

## 【0143】

培養は上記(2)に準じて行うことができる。

上記形質転換体において、本発明のポリペプチドと任意の組換え糖タンパク質(例えば医薬用組換え糖タンパク質)を、糖鎖合成可能な形質転換体中で同時に生産させることにより、該組換え糖タンパク質に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を付加することができる。

## 【0144】

また、上記(2)で取得した動物個体または植物個体を用い、上記(2)の方法に準じて、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

## 【0145】

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該生成物を採取することにより、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースま

たはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0146】

該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該生産物を採取することにより、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0147】

上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中で、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基またはN-アセチルグルコサミン単糖に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

【0148】

即ち、N-アセチルグルコサミン単糖、N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはN-アセチルグルコサミン残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質を受容基質として、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源およびウリジン-5'-二リン酸ガラクトース(UDP-Gal)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

【0149】

上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中で、糖鎖の非還元末端に存在するグルコース残基またはグルコース単糖に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

## 【0150】

即ち、グルコース単糖、グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはグルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質を受容基質として、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源およびUDP-Galを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

## 【0151】

酵素源は、アガラクトラクトーN-ネオテトラオース (agalact lacto-N-neotetraose, GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc) を基質として、37℃で1分間に1 $\mu$ モルのラクトーN-テトラオース (lacto-N-tetraose, Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc) を生成することのできる活性を1単位(U)として、0.1mU/l $\sim$ 10,000U/lであり、好ましくは1mU/l $\sim$ 1,000U/lの濃度で用いる。

## 【0152】

水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。更に、上記(2)記載の培養により得られた形質転換体の培養液、上記(2)記載の非ヒトトランスジェニック動物より得られたミルクを水性媒体として用いることもできる。

## 【0153】

水性媒体に、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン(例えばナイ

ミーンS-215、日本油脂社製)等の非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド(例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製)等のカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネート等のアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン(例えば三級アミンFB、日本油脂社製)等の三級アミン類等、Gal含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。

## 【0154】

界面活性剤は、通常0.1~50g/lの濃度で用いられる。

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチル等が挙げられ、通常0.1~50ml/lの濃度で用いられる。

UDP-Galとしては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。該UDP-Galは0.1~500mMの濃度で用いることができる。

## 【0155】

上記において、N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖としては、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc、GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)Gal $\beta$ 1-4Glc、GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc、GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc、またはこれらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有するオリゴ糖等をあげることができる。

## 【0156】

N-アセチルグルコサミン残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質としては、上記オリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖を含有する複合糖質、あるいはアシアロアガラクト複合型N結合型糖鎖を含有する複合糖質等をあげることができる。

## 【0157】

受容基質は0.01~500mMの濃度で用いることができる。

該生成反応において、必要に応じてMnCl<sub>2</sub>等の無機塩、 $\beta$ -メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール等を添加することができる。

生成反応は水性媒体中、pH 5～10、好ましくは pH 6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。

【0158】

上記方法により生産される糖鎖または複合糖質より、公知の酵素的手法または化学的手法により糖鎖の一部を切り出すことができる〔日本生化学会編、続生化学実験講座、第4巻、複合糖質研究法Ⅰ,Ⅱ,東京化学同人、(1986年)、谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原和幸 監修、グリコバイオロジー実験プロトコール、秀潤社、(1996年)〕。

【0159】

(4) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の作製

(i) ポリクローナル抗体の作製

上述(2)の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0160】

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100μgが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0161】

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

【0162】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清より、下記方法によりポリクローナル抗体を分離、精製することができる。

抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0163】

(ii) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

【0164】

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0165】

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

【0166】

例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1（以下、P3-U1と略す）[Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X

63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン ( $1.5 \text{ mM}$ )、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ )、ジェンタマイシン ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を  $2 \times 10^7$  個以上用いる。

## 【0167】

## (c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム  $1.83 \text{ g}$ 、リン酸一カリウム  $0.21 \text{ g}$ 、食塩  $7.65 \text{ g}$ 、蒸留水  $1 \text{ リットル}$ 、 $\text{pH} 7.2$ ) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 =  $5 \sim 10 : 1$  になるよう混合し、 $1,200 \text{ rpm}$  で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

## 【0168】

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、 $37^\circ\text{C}$  で、 $10^8$  抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000)  $2 \text{ g}$ 、MEM  $2 \text{ ml}$  およびジメチルスルホキシド (DMSO)  $0.7 \text{ ml}$  を混合した溶液を  $0.2 \sim 1 \text{ ml}$  添加し、更に1~2分間毎にMEM培地  $1 \sim 2 \text{ ml}$  を数回添加する。

## 【0169】

添加後、MEM培地を加えて全量が  $50 \text{ ml}$  になるように調製する。該調製液を  $900 \text{ rpm}$  で5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4} \text{ M}$ )、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) を加えた培地]  $100 \text{ ml}$  中に懸濁する。

## 【0170】

該懸濁液を96穴培養用プレートに  $100 \mu\text{l}$  /穴ずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$  イ

ンキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディーズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている 酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

#### 【0171】

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

#### 【0172】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### 【0173】

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristanane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

#### 【0174】

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。



得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

#### 【0175】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。抗体のクラスとは抗体のアイソタイプのこと、ヒトでは、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEがあげられる。サブクラスとは、クラス内のアイソタイプのこと、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられる。

#### 【0176】

抗体の蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(5) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた疾患の治療や診断等への利用

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕を用いた癌転移抑制等の疾病の治療、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法を用いたそれら癌の診断に利用することが可能である。

#### 【0177】

例えば、上記(1)記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

即ち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制を行うことが可能である。

#### 【0178】

また、本発明のDNAあるいは該DNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポ

リペプチドをコードするDNAの発現量を定量することができる。

更に、本発明のDNAをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社（1993年）〕を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

【0179】

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。したがって、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、該遺伝子の構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

【0180】

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。例えば、ヒト大腸癌細胞あるいはヒト膵臓癌細胞で、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。具体的には、例えば、配列番号3で表される塩基配列の1～5000番目の塩基配列中の連続する50～5000bpの配列を有するプロモーターDNAをあげることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング法に利用することができる。

【0181】

糖転移酵素遺伝子には多型や変異が存在することが知られている。例えば、A B O式血液型の決定に関与する糖転移酵素に関しては、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより以下の3種の酵素が生成される。

A型抗原の合成に関与する $\alpha$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素、B型抗原の合成に関与する $\alpha$ 1,3-ガラクトース転移酵素、およびO(H)型糖鎖の生成に関与する活性を持たない酵素〔Nature, 345, 229-233 (1990)〕。

【0182】

またルイス式血液型の決定に関与する $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (F u c - T I I I) の場合も、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより、活性が低下または消失した酵素が生成することが知られている [J. Biol. Chem. 269, 29271-29278 (1994)、Blood 82, 2915-2919 (1993)、J. Biol. Chem. 269, 20987-20994 (1994)、J. Biol. Chem. 272, 21994-21998 (1997)]。

【0183】

F u c - T I I I 遺伝子の多型は、大腸癌における癌関連糖鎖抗原であるシアリルルイス a 糖鎖の発現と密接な関係があることが知られている [Cancer Res. 56, 330-338 (1996)、Cancer Res. 58, 512-518 (1998)]。

従って、F u c - T I I I の多型を調べることにより、病気の診断や予後の予測を行うことができると考えられる。

【0184】

本発明の新規 $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素は、大腸癌や膵臓癌においてシアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖の合成に関与することから、本遺伝子の多型を調べることにより、大腸癌や膵臓癌の診断や予後の予測に利用できる。

【0185】

また、本遺伝子の多型と、本遺伝子が発現している臓器（胃、空腸、大腸、膵臓など）における疾患との関連を調べることにより、他の疾患の診断にも利用できる。

本遺伝子の多型解析は、本遺伝子の遺伝子配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サザンブロット法、ダイレクトシーケンス法、PCR法、DNAチップ法などを用いて遺伝子多型を解析することができる [臨床検査, 42, 1507-1517 (1998)、臨床検査, 42, 1565-1570 (1998)]。

【0186】

(6) 本発明のポリペプチドの利用

(a) 本発明の抗体作製への利用

本発明のポリペプチドを用い、上記(4)の方法により本発明の抗体を作製することができる。

【0187】

(b) 本発明のポリペプチドを用いる糖鎖、複合糖質製造への利用

本発明のポリペプチドを用い、ガラクトースが $\beta$  1, 3 結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

(c) 本発明のポリペプチドの活性に関与する物質のスクリーニングへの利用

本発明のポリペプチドは、下記(8)の(a)の方法により、該ポリペプチドの活性を増強または阻害する化合物をスクリーニングすることができる。

【0188】

(7) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量

本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等をあげることができる。

【0189】

免疫学的定量法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、 $^{125}\text{I}$ 等の放射性同位体で標識した本発明の蛋白質と本発明の蛋白質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

上記検出あるいは定量法は、大腸癌、膵臓癌等の診断に利用することができる

【0190】

(b) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、医薬、例えば大腸癌、膵臓癌等の疾患の治療薬として用いることができる。

【0191】

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該化合物単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一

緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

#### 【0192】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

#### 【0193】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

#### 【0194】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0195】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

【0196】

(8) スクリーニング法への応用。

本発明の新規 $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素ポリペプチドは、大腸癌細胞や膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与することから、該ポリペプチドの活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるタイプ1糖鎖の合成量を増加または低下させることが可能である。

【0197】

また、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御し、細胞におけるタイプ1糖鎖の合成量を制御することが可能である。

【0198】

タイプ1糖鎖の合成量を抑制する化合物は、癌転移抑制に有用と考えられる。一方、タイプ1糖鎖の合成量を増加させる化合物は、タイプ1糖鎖の合成に有用と考えられる。

上記の化合物は、以下(a)～(e)に示す方法により取得可能である。

【0199】

(a) 上記(2)で記載した方法を用いて調製した本発明の新規 $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド(精製物あるいは該ポリペプチドを発現する形質転換体の細胞抽出液または培養上清)を酵素として用い、被験試料の存在下、公知の方法[J. Biol. Chem. 258, 9893-9898 (1983)、J. Biol. Chem. 262, 15649-15658 (1987)、Archi. Biochem. Biophys. 270, 630-646 (1989)、Archi. Biochem. Biophys. 274, 14-25 (1989)、特開平06-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)]を用いて $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性を

測定し、 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0200】

(b) 本発明のポリペプチドを発現する細胞または上記(2)で記載した形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)の培養法で2時間から1週間培養後、細胞表面のシアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖等のタイプ1糖鎖の量を、それぞれの糖鎖に対する抗体を用いて測定し、該糖鎖量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0201】

上記抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(4)で記載した本発明の抗体を用いて測定し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0202】

本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(d) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードする遺伝子転写産物の量を、上記(5)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0203】

(e) 上記(4)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記(2)記載の動物細胞に、上記(2)記載の方法に準じて導入し、形質転換体を取得する。該形

質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993)、*Biotechniques*, 20, 914 (1996)、*J. Antibiotics*, 49, 453 (1996)、*Trends in Biochemical Sciences*, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

#### 【0204】

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

#### 【0205】

##### (9) ノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、*Nature*, 326, 6110, 295 (1987)、*Cell*, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔例えば、*Nature*, 350, 6315, 243 (1991)〕。

#### 【0206】

このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、非ヒト動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。

該キメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体(ノックアウト非ヒト動物)を得ることができる。

#### 【0207】

このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコード



するDNAの任意の位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

【0208】

またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

【0209】

このような例として、脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例 [Cell, 87, 7, 1317 (1996)] やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例 [Science, 278, 5335, (1997)] が知られている。

【0210】

従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有するノックアウト非ヒト動物を作製することが可能である。

【0211】

このようなノックアウト非ヒト動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。

従って、本発明のノックアウト非ヒト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0212】

【実施例】

以下実施例を示す。遺伝子操作的手法として、断らない限りモレキュラー・クロニング第2版に記載された方法を用いた。

【0 2 1 3】

実施例 1 各種細胞株におけるタイプ 1 糖鎖の発現量と既知  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量の測定

各種ヒト癌細胞株におけるタイプ 1 糖鎖（シアリルルイス a 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖）の発現量と既知のヒト  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を測定することにより、大腸癌細胞株あるいは膵臓癌細胞株でタイプ 1 糖鎖の合成に関与する  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素の同定を試みた。

【0 2 1 4】

各種細胞株におけるタイプ 1 糖鎖（シアリルルイス a 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖）の発現量の測定は、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体、抗ルイス a 糖鎖抗体、または抗ルイス b 糖鎖抗体を用いた蛍光抗体染色後、FACS を用いて解析することにより行った（図 1 の A）。

【0 2 1 5】

各種ヒト細胞株における既知  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素（ $\beta$  3 Gal-T 1、 $\beta$  3 Gal-T 2、 $\beta$  3 Gal-T 3、 $\beta$  3 Gal-T 4）遺伝子の転写物の定量は、RT-PCR 法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 2725 (1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平 06-181759、J. Biol. Chem., 273, 26729 (1998)] を用いて行った。各種細胞株における各  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる  $\beta$ -アクチンの転写産物の量を 1000 とした時の相対値として表示した（図 1 の B）。

【0 2 1 6】

(1) 各種細胞株におけるタイプ 1 糖鎖（シアリルルイス a 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖）の発現量の測定

細胞株としては、大腸癌細胞株（Colo205、Colo201、SW1116、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620）、膵臓癌細胞株（Capan-1、Capan-2）、胃癌細胞株（KATOIII、MKN45、MKN74）、肺癌細胞株（PC-1）、神経芽細胞腫細胞株（SK-N-MC、SK-N-SH）、リンパ腫細胞株（Namalwa、Jurkat）、前立腺癌細胞株（PC-3）を用いた。

【0217】

Colo205、Colo201、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620、Capan-1、Capan-2、KATOIII、MKN45、MKN74、PC-1、SK-N-MC、SK-N-SH、Namalwa、PC-3はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection; ATCC)より入手した。また、SW1116 (ATCCより入手可能) およびJurkat (理研ジーンバンク; RIKEN GENE BANKより入手可能) は愛知県がんセンターの高橋博士より入手した。

【0218】

上記の細胞をそれぞれの細胞に適した培地で培養後、各細胞を抗シアリルルイス a 糖鎖抗体 (19-9)、抗ルイス a 糖鎖抗体 (7LE)、または抗ルイス b 糖鎖抗体 (Neokokusai社製) を用いて蛍光抗体染色し、FACSを用いて解析した。

【0219】

具体的方法を以下に示す。

各細胞 (約  $1 \times 10^6$ ) をマイクロチューブ (1.5 ml: エッペンドルフ社製) にとり、遠心分離 ( $550 \times g$ 、7分間) により細胞を集めた。

該細胞を 0.9 ml の 0.1% のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 PBS (A-PBS:  $8 g/l NaCl$ 、 $0.2 g/l KCl$ 、 $1.15 g/l Na_2HPO_4$  (無水)、 $0.2 g/l KH_2PO_4$ 、0.1% アジ化ナトリウム) で洗浄した後、該洗浄細胞に A-PBS で約  $10 \mu g/ml$  に希釈した上記抗糖鎖抗体を  $20 \mu l$  加えて懸濁し、 $4^\circ C$  で 1 時間反応させた。

【0220】

反応後、細胞を 0.9 ml の A-PBS で 1 回洗浄した後、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) で蛍光標識した抗マウス IgM/IgG 抗体 (Bio-Rad社製) を A-PBS で 16 倍希釈した溶液を  $20 \mu l$  加えて懸濁し、 $4^\circ C$  で 30 分間反応させた。

【0221】

反応後、細胞を 0.9 ml の A-PBS で 1 回洗浄した後、0.6 ml の A-PBS に懸濁し、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター [エピックス・エリート・フローサイトメーター (EPICS Elite Flow Cytometer);

コールター (COULTER) 社製] を用いて解析を行なった。また対照実験として、抗糖鎖抗体の代わりに A-PBS を用いて同様の解析を行なった。

【0222】

結果を図1のAに示す。大腸癌細胞株である Colo205、Colo201、SW1116、および膵臓癌細胞株である Capan-2 においてタイプ1糖鎖が多く発現していること確認した。

(2) 各種ヒト細胞株における既知  $\beta 1$ , 3-ガラクトース転移酵素 ( $\beta 3 \text{Gal-T1}$ ,  $\beta 3 \text{Gal-T2}$ ,  $\beta 3 \text{Gal-T3}$ ,  $\beta 3 \text{Gal-T4}$ ) 遺伝子の転写物の定量

(a) 各種細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

上記(1)記載の細胞株から酸グアニジウム チオシアネート フェノールクロロホルム法 [Anal. Biochem. 162, 156-159] により全 RNA を抽出した。

【0223】

全 RNA 各々  $6 \mu\text{g}$  に、デオキシリボヌクレアーゼ I (Life Technologies 社製) を 5 単位/ $\text{m}1$  ずつ添加し、室温で 5 分間反応させた。反応後、 $65^\circ\text{C}$  で 15 分間加熱することにより、酵素を失活させた。

得られた全 RNA 各々について、オリゴ (dT) プライマーを用いて SUPERSCR IPT<sup>TM</sup> Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies 社) により cDNA を合成した。反応は  $20 \mu 1$  で行い、反応後の溶液を水で 50 倍希釈し、使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保管した。

【0224】

(b) スタンダードと内部コントロールの調製

検量線の作成に用いるスタンダードとしては、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T1}$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T2}$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T3}$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T4}$  の各 cDNA を pUC119 または pBluescript SK(-) に組み込んだプラスミド (pUC119-3GT1, pBS-3GT2, pBS-3GT3, pBS-3GT4) を、各 cDNA 部分を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状 DNA に変換したものをを用いた。

【0225】

pUC119-3GT1 は、特開平 6-181759 記載のプラスミド pUC119-WM1 (FERM B

P-4011)と同じものである。ヒトβ3Gal-T2、ヒトβ3Gal-T3およびヒトβ3Gal-T4の各cDNAの取得は、以下のように行った。

各cDNAの配列に特異的なプライマーを用いてPCRを行うことにより各cDNAの断片を取得した。

【0226】

取得された各cDNA断片をプローブとして用いて、コロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより、それぞれのcDNAを取得した。ヒトβ3Gal-T2、ヒトβ3Gal-T3およびヒトβ3Gal-T4の塩基配列を、LI-COR社のDNAシーケンサー (dna sequencer model 4000L) またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー 377と、各シーケンサー用の反応キットを用いて決定し、それぞれヒトβ3Gal-T2、ヒトβ3Gal-T3、ならびにヒトβ3Gal-T4をコードすることを確認した。各cDNAは公知の配列をもとにしたPCRによっても得ることができる。

【0227】

β-アクチンの転写産物定量用のスタンダードとしては、pUC119-ACTをcDNA部分を切り出す制限酵素 (HindIIIとAsp718) で切断して直鎖状DNAに変換したものを用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759]。

【0228】

内部コントロールとしては、下記のようにして調製したプラスミド (pBS-3GT1d、pBS-3GT2d、pBS-3GT3d、pBS-3GT4d) を、各cDNAを切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状DNAに変換したものを用いた。

pUC119-3GT1において、ヒトβ3Gal-T1 cDNA中のBanII-EcoRV間212bpを欠失させることによりpUC119-3GT1dを作製した。

【0229】

pBS-3GT2において、ヒトβ3Gal-T2 cDNA中のAflII-BstEII間258bpを欠失させることによりpBS-3GT2dを作製した。

pBS-GT3において、ヒトβ3Gal-T3 cDNA中のStyI-StyI間

183bpを欠失させることによりpBS-3GT3dを作製した。

【0230】

pBS-3GT4において、ヒト $\beta$ 3Gal-T4 cDNA中のAccIII-StyI間253bpを欠失させることによりpBS-3GT4dを作製した。

$\beta$ -アクチンの転写産物定量用の内部コントロールとしては、pUC119-ACTdをcDNA部分を切り出す制限酵素 (HindIIIとAsp718)で切断して直鎖状DNAに変換したものをを用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759]。

【0231】

(c) RT-PCRによる転写量の定量

上記各組織由来のcDNA 10 $\mu$ lおよび内部コントロール用プラスミド10 $\mu$ l (10fg)を含む50 $\mu$ lの反応溶液 [10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 $\mu$ M 遺伝子特異的プライマー]で、DNAポリメラーゼAmpliTaq Gold<sup>TM</sup> (Parkin Elmer社)を用いてPCRを行った。

【0232】

各遺伝子特異的プライマーの塩基配列を第1表に示した。また、 $\beta$ 3Gal-T1遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号4、5に、 $\beta$ 3Gal-T2遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号6、7に、 $\beta$ 3Gal-T3遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号8、9に、 $\beta$ 3Gal-T4遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号10、11に、 $\beta$ -アクチン特異的プライマーの塩基配列を配列番号12、13に示した。

【0233】

【表 1】

第 1 表 定量的 PCR に使用した条件とプライマー

ターゲット 遺伝子	* プライマーセット	PCR 産物のサイズ (bp)		アニーリング 温度 (°C)
		ターゲット	コンペティター	
<i>β3Gal-T1</i>	F: 5' - TTCAGCCACCTAACAGTTGCCAGG - 3'	495	283	60
	R: 5' - ATACCTTCTTCGTGGCTTGGTGGAG - 3'			
<i>β3Gal-T2</i>	F: 5' - TAGAAGCTAGAAGAGCTATTGGGC - 3'	616	358	60
	R: 5' - ACTGGCCAGTGATTGAACACACAAAC - 3'			
<i>β3Gal-T3</i>	F: 5' - CCCAATGCCAAGTACGTAATGAAG - 3'	474	291	60
	R: 5' - TGTGGTGTTCCTTAGCATGACCTG - 3'			
<i>β3Gal-T4</i>	F: 5' - TTGATCCCCAACCCAGGAAGCTTGC - 3'	590	337	68
	R: 5' - TGAGGCCACTGCTCCTCTGATACG - 3'			
<i>β3Gal-T5</i>	F: 5' - ACCACCAGCAGTGCAGCGGGAAC - 3'	554	410	65
	R: 5' - GCCACGATCCTCCTGAAGAGGCA - 3'			
<i>β-Actin</i>	F: 5' - GATATCGCCGCGCTCGTCGTCGAC - 3'	789	639	60
	R: 5' - CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTGC - 3'			

\* F : フォワードプライマー、 R : リバースプライマー

上記プライマーのセットにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードからは、第1表のターゲットのところに示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。一方、上記プライマーのセットにより、各内部コントロールからは、第1表のコンペティターのところに示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

## 【0234】

PCRは、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、各遺伝子に適した第1表に記載のアニーリング温度で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子群については42サイクル、 $\beta$ -アクチンについては24サイクルの条件で行った。

## 【0235】

PCR後の溶液のうち10  $\mu$ lを1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、写真を撮影した。写真をNIHイメージシステムによりスキヤニングすることにより増幅した断片の染色の強さを測定し、増幅量とした。

## 【0236】

細胞由来cDNAのかわりに上記で調製したスタンダードプラスミドを1.25 fg、2.5 fg、5 fg、10 fg、20 fg、40 fg用いて、PCRを行い、増幅断片の増幅量を測定し、cDNAの量と断片の増幅量をプロットして検量線を作成した。

## 【0237】

この検量線と各細胞由来cDNAでの断片の増幅量から、各細胞でのcDNAの量を計算し、これを各細胞でのmRNA転写量すなわち遺伝子の発現量とした。なお、 $\beta$ -アクチンは各細胞で普遍的に発現している遺伝子と考えられるため、どの細胞においてもその発現量は同程度と考えられる。従って、各細胞における $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量の差は、cDNA合成反応の効率の差と考えられるため $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を比較する際に $\beta$ -アクチンの発現量も考慮した。

## 【0238】



各種細胞株における各  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量を、 $\beta$ -アクチンの転写産物の量を 1000 とした時の相対値として表示した (図 1 の B)。

$\beta$  3 Gal-T1、 $\beta$  3 Gal-T2 および  $\beta$  3 Gal-T3 は Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を合成する活性を有しているが、タイプ 1 糖鎖を多く発現している大腸癌細胞株 (Colo205、Colo201、SW1116) および膵臓癌細胞株 (Capan-2) ではほとんど発現していなかった。一方、 $\beta$  3 Gal-T4 は大腸癌細胞株 (Colo205、Colo201、SW1116) および膵臓癌細胞株 (Capan-2) で発現がみられたが、この酵素は Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を合成する活性を有していないことが明らかになっている。

#### 【0239】

以上の結果から、これらの細胞株においてタイプ 1 糖鎖の合成に関与している  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素は、新規の酵素であることが明らかになった。

#### 【0240】

実施例 2 大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイス a 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖の合成に関与する、新規  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子 (cDNA) のクローニング

(1) ヒト大腸癌細胞株 Colo205 からの mRNA の取得

ヒト大腸癌細胞株 Colo205 より、ロッシュ (Roche) 社製の mRNA 抽出キットである Oligotex<sup>TM</sup>-dT30<super>を用いて、約 30  $\mu$ g の mRNA を取得した。

#### 【0241】

具体的試薬および方法は、キットに添付されている説明書に従った。

(2) ヒト大腸癌細胞株 Colo205 由来 cDNA のライブラリーの作製

上記 (1) で取得したヒト大腸癌細胞株 Colo205 由来の mRNA 8  $\mu$ g、および GIBCO BRL 社製のキット (SUPERScript Choice System for cDNA Synthesis) を用い、オリゴ dT をプライマーとして 2 本鎖 cDNA を合成した。

#### 【0242】

これら二本鎖 cDNA の両末端に以下の方法で SfiI リンカーを付与した。

〔S f i I リンカーの付与〕

配列番号14で示された一本鎖DNAおよび配列番号15で示された一本鎖DNAをアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

【0243】

該合成一本鎖DNAをそれぞれ50  $\mu$ gずつ、別々に50 mM トリス-HCl (pH 7.5)、10 mM  $MgCl_2$ 、5 mM ジチオスレイトール (以下、D TTと略記する)、0.1 mM EDTAおよび1 mM ATPを含む緩衝液 (以下、T4 キナーゼ緩衝液と略記する) 50  $\mu$ lに溶解し、T4 ポリヌクレオチド キナーゼ (宝酒造社製) 30単位を加えて、37℃で16時間リン酸化反応を行ない、11塩基および8塩基のリンカーを取得した。

【0244】

11塩基のリンカー 4  $\mu$ g、8塩基のリンカー 2.9  $\mu$ gおよび上記で合成した2本鎖cDNAをT4リガーゼ緩衝液45  $\mu$ lに溶解後、T4 DNAリガーゼ1050単位を加え、16℃で16時間反応させ、該二本鎖DNA各々にS f i I リンカーを付与した。

【0245】

得られた反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.5 kb以上のDNA断片を回収した。

直接発現クローニングベクター (Expression Cloning Vector) であるpAM o [J.Biol.Chem., 268, 22782(1993)、別名pAM o PRC3Sc (特開平05-336963)] 24  $\mu$ gを、10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、6 mM  $MgCl_2$ 、50 mM NaCl、6 mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液 (以下、Y-50緩衝液と略記する) 590  $\mu$ lに溶解後、80単位のS f i I (宝酒造社製、以下、特に断らないかぎり制限酵素は宝酒造社製のものを用いた) を加え、37℃で16時間消化反応を行なった。

【0246】

該反応液に40単位のB a m H Iを加え、37℃で2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約8.8 kbのDNA断片を回収

した。

上記で調製した S f i I リンカーを付与した DNA (mRNA 8  $\mu$ g 由来分) を T4 リガーゼ緩衝液 250  $\mu$ l に溶解後、それぞれの溶解液に、該約 8.8 kb の DNA 断片 2  $\mu$ g および T4 DNA リガーゼ 2000 単位を加えて、16  $^{\circ}$ C で 16 時間結合反応を行なった。

【0247】

反応後、それぞれの反応液にトランスファー RNA (tRNA) 5  $\mu$ g を添加し、エタノール沈殿後、10 mM トリス-HCl (pH 8.0) および 1 mM EDTA (エチレンジアミン 4 酢酸ナトリウム) からなる緩衝液 (以下、TE 緩衝液と略記する) 20  $\mu$ l に溶解した。

【0248】

該反応液を用い、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] により大腸菌 LE392 株 [モレキュラー・クローニング第 2 版] を形質転換し、約 100 万個のアンピシリン耐性を有する形質転換体を取得し、cDNA ライブラリーを構築した。

【0249】

更に、該 cDNA ライブラリー (大腸菌) および、キアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである  $\phi$ plasmid/maxi kit (商品番号 41031) を用い、cDNA を含有するプラスミドを調製した。

【0250】

(3) degenerate プライマーを用いた新規  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素 cDNA 断片の取得

既知の 4 種の  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2、 $\beta$ 3Gal-T3、 $\beta$ 3Gal-T4) のアミノ酸配列を比較することにより、4 種の  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素でアミノ酸配列がよく保存されている領域を 3ヶ所以上見出した。該 3 領域を N 末端側から順にモチーフ 1、モチーフ 2、モチーフ 3 と呼ぶ。上記 4 種の  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素における各モチーフのアミノ酸配列と各モチーフの最初のアミノ酸の N 末端からの番号を第 2 表に示す。

【 0 2 5 1 】

【表 2】

第 2 表  $\beta$ 3Gal-Tファミリーにおいて保存されたアミノ酸配列モチーフ

	モチーフ 1	モチーフ 2	モチーフ 3
$\beta$ 3Gal-T1	A <sup>99</sup> IRETWG	Y <sup>172</sup> VMKTDSD	E <sup>264</sup> DVYVGLC
$\beta$ 3Gal-T2	A <sup>169</sup> IRQTWG	Y <sup>247</sup> VMKTDSD	E <sup>340</sup> DVYVGIC
$\beta$ 3Gal-T3	A <sup>96</sup> IRVTWG	Y <sup>175</sup> VMKTDTD	E <sup>266</sup> DVYVGIC
$\beta$ 3Gal-T4	A <sup>89</sup> IRASWG	Y <sup>170</sup> VLKTDDD	E <sup>290</sup> DFYVGVS

公知の方法 [Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler, "PCR Primer: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab.(1995)、井上純一郎・仙波憲太郎編, ザ・プロトコールシリーズ「cDNAクローニング」, 羊土社, (1996年)、Science, 241, 42 (1988)] に従って、各モチーフのアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するdegenerateプライマーを設計した。フォワードプライマーとしてモチーフ1とモチーフ2に対応する2種の合成DNA (それぞれの配列を配列番号16と配列番号17に示す) を合成した。また、リバープライマーとして、モチーフ2とモチーフ3に対応する2種の合成DNA (それぞれの配列を配列番号18と配列番号19に示す) を合成した。

【 0 2 5 2 】

配列番号16記載のDNAと配列番号18記載のDNAをプライマー、上記(2)で調製したcDNAライブラリー(プラスミド)を鋳型としてPCRを行い、増幅断片の末端をDNAポリメラーゼ クレノー断片を用いて平滑末端に変換した後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) のEcoRVサイトにサブクローニングした。また、配列番号17記載のDNAと配列番号19記載のDNAをプライマー、上記(2)で調製したcDNAライブラリー(プラスミド)を鋳型としてPCRを行い、増幅断片の末端をDNAポリメラーゼ クレノー断片を用いて平滑末端に変換した後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) のEcoR

Vサイトにサブクローニングした。

【0253】

上記(2)で調製したcDNAライブラリー(プラスミド100ng)を含む50 $\mu$ lの反応溶液[10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP、0.001% (w/v)ゼラチン、0.2 $\mu$ Mプライマー]に、1UのDNAポリメラーゼAmpliTaq Gold<sup>TM</sup> (Parkin Elmer社)を添加し、PCRを行った。

【0254】

PCRは、95℃で11分間の加熱後、95℃で30秒間、35℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、45サイクルの条件で行った。

サブクローニングしたPCR増幅断片の塩基配列は、EPICENTRE TECHNOLOGIES社のキット(SequiTherm EXCEL II Long-Read DNA Sequencing kit-ALF: Catalog No. SE8301A)とALF DNAシーケンサー(アマーシャム ファルマシア バイオテック社製)を用いて決定した。

【0255】

その結果、配列番号16記載のDNAと配列番号18記載のDNAをプライマーとして用いたPCRにより、既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を1種取得した。

【0256】

該DNA断片のプライマー部分を除く配列は、配列番号2記載のDNAの643番目から851番目の塩基配列と一致していた。

また、配列番号17記載のDNAと配列番号19記載のDNAをプライマーとして用いたPCRにより、既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を1種取得した。

【0257】

該DNA断片のプライマー部分を除く配列は、配列番号2記載のDNAの87

6番目から1124番目の塩基配列と一致していた。

(4) 新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素cDNAの取得

上記(3)で取得した2種のPCR増幅断片を混合後、マルチプライムDNA標識システム(アマシャム社)を用いて $^{32}\text{P}$ で標識し、プローブを作製した。

【0258】

該プローブを用いて、上記(2)で作製したcDNAライブラリーの内の $5 \times 10^5$ クローンについてコロニーハイブリダイゼーションを行った。

該ハイブリダイゼーションにおいて、フィルターを、2倍濃度のSSPE〔1倍濃度のSSPEの組成は、180mM塩化ナトリウム、10mMリン酸二水素ナトリウム、1mMエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)よりなる(pH7.4)〕、0.1%SDSよりなる緩衝液中で65℃、10分間振とうする条件で2回、1倍濃度のSSPE、0.1%SDSからなる緩衝液中で65℃、15分間振とうする条件で1回、0.2xSSPE、0.1%SDSからなる緩衝液中で65℃、10分間振とうする条件で2回洗浄した。

【0259】

該コロニーハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする2個の独立したプラスミドが得られた。

(5) プラスミドpAMo-3GT5中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定

上記(4)で得られたプラスミドの1つであるpAMo-3GT5が含むcDNAの全塩基配列を、以下の方法で決定した。

【0260】

pAMoベクター中の配列に特異的なプライマーを用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。

決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。

【0261】

該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。

塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー(dNA sequence

r model 4000L) と反応キット (Sequithe<sup>TM</sup> EXCEL II<sup>TM</sup> Long-Read<sup>TM</sup> DNA-sequencing kit-Lc:エア・ブラウン)、またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー377と反応キット (ABI Prism<sup>TM</sup> BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:Applied Biosystems社) を使用した。

【0262】

pAMo-3GT5が含むcDNAの全塩基配列(2775bp)を配列番号2に示した。

該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する310アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。

【0263】

該ポリペプチドはこれまでにクローン化された4種のヒト $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素( $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2、 $\beta$ 3Gal-T3、 $\beta$ 3Gal-T4)とアミノ酸レベルで28%~37%の相同性を示したことから、新規な $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素であると考えられた。該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に示した。

【0264】

該ポリペプチドは、N末端の7アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも4アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。他の $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも4アミノ酸からなると予想された。したがって、31番目から310番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

【0265】

以下、該cDNAをヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNA、該cDNAがコードするポリペプチドをヒト $\beta$ 3Gal-T5と呼ぶ。

pAMo-3GT5をHindIIIとNotIで切断することによりヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNAを切り出し、pBluescript II SK(+)のHindIIIとNotI

I サイト間に組み込むことにより、pBS-3GT5 を造成した (図 2)。

【0266】

pBS-3GT5 を含む大腸菌である Escherichia coli MM294/pBS-3GT5 は、平成 11 年 2 月 10 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM BP-6645 として寄託されている。

(6) ヒト  $\beta$ 3Gal-T5 発現プラスミドを導入したヒト培養細胞におけるタイプ 1 糖鎖の合成

コントロールプラスミド (pAMo) およびヒト  $\beta$ 3Gal-T5 発現プラスミド (pAMo-3GT5) をそれぞれ、 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるように TE 緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により Namalwa 細胞に導入し、形質転換細胞を得た。

【0267】

1.  $6 \times 10^6$  細胞あたり  $4 \mu\text{g}$  のプラスミドを導入した後、10% のウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地 [7.5%  $\text{NaHCO}_3$  を 1/40 量、200 mM L-グルタミン溶液 (GIBCO 社製) を 3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (GIBCO 社製、5000 units/ml ペニシリン、5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン) を 0.5% 添加した RPMI1640 培地 (日水製薬社製)] 8 ml に懸濁し、 $\text{CO}_2$  インキュベーターで  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養した。

【0268】

培養後、G418 (ギブコ社製) を  $0.8 \text{ mg}/\text{ml}$  になるように添加し、更に 14 日間培養し安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、 $0.8 \text{ mg}/\text{ml}$  の G418 を含む RPMI1640 で継代した。

該形質転換細胞について、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2: Kyowa Medex 社製) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

【0269】

間接蛍光抗体染色は、実施例 1 の (1) に記載した方法に従って行った。その結果、pAMo-3GT5 を導入した細胞においては、pAMo を導入した細胞に比較して、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2) への反応性が大幅に増加していた (図 3 の A)。



## 【0270】

また、コントロールプラスミド (pAMo) およびヒト  $\beta 3 \text{Gal-T5}$  発現プラスミド (pAMo-3GT5) を上記と同様の方法により、タイプ1糖鎖を発現していない大腸癌細胞株であるHCT-15に導入し、安定形質転換細胞を得た。次いで、限界希釈法を用いて該形質転換細胞からシングルクローン (HCT-3GT5L およびHCT-3GT5H) を取得した。HCT-3GT5Lにおける  $\beta 3 \text{Gal-T5}$  転写物の量は、HCT-3GT5Hにおける  $\beta 3 \text{Gal-T5}$  転写物の量に比較して少ない (実施例4 および第3表参照)。該シングルクローンは、0.8 mg/ml のG418を含むRPMI1640で継代した。

## 【0271】

取得したシングルクローン (HCT-3GT5H) について、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体 (19-9)、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2: Kyowa Medex社製)、抗ルイス a 糖鎖抗体 (7LE)、または抗ルイス b 糖鎖抗体 (ネオ国際社製) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

## 【0272】

間接蛍光抗体染色は、実施例1の(1)に記載した方法に従って行った。その結果、pAMo-3GT5を導入した細胞においては、pAMoを導入した細胞に比較して、4種の抗体全てへの反応性が大幅に増加していることが明らかになった (図3のB)。

## 【0273】

以上の結果から、 $\beta 3 \text{Gal-T5}$  は形質転換細胞中で、タイプ1糖鎖 (シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖およびルイス b 糖鎖) を合成可能であることが示された。

またこの結果は、 $\beta 3 \text{Gal-T5}$  を細胞で発現させることにより、タイプ1糖鎖 (シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖およびルイス b 糖鎖等) を含有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質を新たに合成できることを意味している。

## 【0274】

以上のことより、 $\beta 3 \text{Gal-T5}$  を発現させた細胞を宿主として、有用な糖

タンパク質を分泌生産することにより、分泌生産される糖タンパク質にタイプ 1 糖鎖（シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ルイス a 糖鎖およびルイス b 糖鎖等）を付与することが可能である。

【 0 2 7 5 】

(7) 各種ヒト細胞株におけるヒト  $\beta$  3 G a 1 - T 5 遺伝子の転写物の定量

実施例 1 の (2) の方法に従って、ヒト  $\beta$  3 G a 1 - T 5 遺伝子の転写物の定量を行った。

鋳型として用いる各種細胞株由来一本鎖 c D N A は、実施例 1 (1) で調製したものを使用した。

【 0 2 7 6 】

検量線の作成に用いるスタンダードとしては、上記 (5) で造成したヒト  $\beta$  3 G a 1 - T 5 c D N A を pBluescript II SK(+) に組み込んだプラスミド (pBS-3GT5) を、c D N A 部分を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状 D N A に変換したものをを用いた。

【 0 2 7 7 】

内部コントロールとしては、下記のようにして調製したプラスミド (pBS-3GT5 d) を、c D N A を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状 D N A に変換したものをを用いた。

pBS-3GT5 において、ヒト  $\beta$  3 G a 1 - T 5 c D N A 中の E c o 8 1 I - X c m I 間 1 4 4 b p を欠失させることにより pBS-3GT5d を作成した。

【 0 2 7 8 】

R T - P C R による転写量の定量は、 $\beta$  3 G a 1 - T 5 特異的プライマーを用いて、実施例 1 の (2) と同様にして行った。 $\beta$  3 G a 1 - T 5 特異的プライマーの塩基配列を第 1 表ならびに配列番号 2 0、2 1 に示した。

$\beta$  3 G a 1 - T 5 特異的プライマーにより、 $\beta$  3 G a 1 - T 5 遺伝子転写産物およびスタンダードからは、第 1 表のターゲットのところに示したサイズ (5 5 4 b p) の D N A 断片を増幅させることができる。一方、上記プライマーにより、内部コントロールからは、第 1 表のコンペティターのところに示したサイズ (4 1 0 b p) の D N A 断片を増幅させることができる。

【0279】

PCRは、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル繰り返す条件で行った。

各種細胞株における $\beta$ 3Gal-T5遺伝子転写産物の量を、 $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した(図4のA)。

【0280】

$\beta$ 3Gal-T5転写産物は、タイプ1糖鎖を多く発現している大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116)および膵臓癌細胞株(Capan-2)で発現していることが判明した。また、 $\beta$ 3Gal-T5転写産物の発現は、タイプ1糖鎖の発現(図1参照)とよく相関していた。

【0281】

以上の結果と上記(5)および(6)の結果を総合すると、 $\beta$ 3Gal-T5は、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖やシアリルルイスc糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与する、新規 $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素であると結論される。

【0282】

(8) 各種ヒト細胞株におけるCA19-9抗原含有タンパク質の発現

抗シアリルルイスa抗体(19-9)を用いたウエスタン・ブロッティング解析を行うことにより、大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116、LS180、HT29、Wid r、HCT-15、SW480、SW620)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、胃癌細胞株(KATOIII、MKN45、MKN74)におけるシアリルルイスa糖鎖含有タンパク質の発現について検討した。

【0283】

19-9は大腸癌や膵臓癌における癌関連糖鎖の検出に利用されており、19-9で検出されるシアリルルイスa糖鎖抗原は、CA19-9抗原と呼ばれている。

各細胞( $1 \times 10^7$ 個)を、溶液[20mM HEPES(pH7.2)、2% T r i r o n X-100]に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。

## 【0284】

該細胞溶解液の蛋白質濃度を、マイクロBCA蛋白質アッセイ試薬キット (PIERCE社) により測定し、 $10 \mu\text{g}$  のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

電気泳動後、Transblot SD cell (Bio-Rad社製) を用いて、ゲル上のタンパク質をImmobilon PVDF膜 (Millipore社製) に移した。

## 【0285】

該膜をブロッキング溶液 (5%のスkimミルクを含むPBS) で4℃で終夜処理することによりブロッキングした。

ブロッキング後、該膜をブロッキング溶液で希釈した $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗シアリルルイスa抗体 (19-9) を用いて、室温で2時間処理した。

## 【0286】

処理後、ECL Western blotting detection reagent (Amersham社製) を用いて該膜を処理することにより、19-9が結合したタンパク質の検出を行った。方法はキットの説明書に従った。

結果を図4のBに示した。

## 【0287】

CA19-9含有糖タンパク質の発現は、上記 (7) で測定した $\beta 3\text{Gal-T}5$ 転写産物の発現 (図4のA参照) とよく一致していた。一方、他のGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素 ( $\beta 3\text{Gal-T}1$ 、 $\beta 3\text{Gal-T}2$ 、 $\beta 3\text{Gal-T}3$ ) の転写物の発現は、CA19-9含有糖タンパク質の発現と相関していなかった。

また、他のGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素 ( $\beta 3\text{Gal-T}1$ 、 $\beta 3\text{Gal-T}2$ 、 $\beta 3\text{Gal-T}3$ ) は、CA19-9含有糖タンパク質を高発現しているColo205やColo201で発現していなかった (図1参照)。

## 【0288】

以上の結果は、 $\beta 3\text{Gal-T}5$ は大腸癌や膵臓癌等における癌関連抗原CA19-9の合成に関与する $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素であることを示している。更に、 $\beta 3\text{Gal-T}5$ が糖タンパク質も基質として使用できることを示している。

【0289】

実施例3 ヒト $\beta$ 3Gal-T5の*in vitro*活性

実施例2で取得したヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNAがコードするヒト $\beta$ 3Gal-T5の*in vitro*での活性を以下のようにして調べた。

他の既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素と活性を比較するため、ヒト $\beta$ 3Gal-T1、ヒト $\beta$ 3Gal-T2、ヒト $\beta$ 3Gal-T3、ヒト $\beta$ 3Gal-T4の各cDNAをpAMoに組み込んだ発現プラスミド (pAMo-3GT1、pAMo-3GT2、pAMo-3GT3、pAMo-3GT4) を造成した。

pAMo-3GT1は、特開平6-181759記載のプラスミドpUC119-WM1 (FERM B P-4011) を構築するために用いたプラスミドpAMoPRWM1と同じものである。

【0290】

コントロールプラスミド (pAMo) または5種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素発現プラスミド (pAMo-3GT1、pAMo-3GT2、pAMo-3GT3、pAMo-3GT4、またはpAMo-3GT5) を、実施例3に記載の方法と同様の方法によりNamalwa細胞に導入し、各形質転換細胞を得た。

【0291】

実施例1の(2)と同様にして、該形質転換細胞から全RNAを抽出し、定量的RT-PCRを用いて、5種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の転写量を測定した。

結果を第3表に示す。

【0292】

【表 3】

第 3 表 アガラクト LN<sub>T</sub> を基質とした時の  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性と  
各細胞における  $\beta$  3Gal-T 転写物の発現量

細胞	%活性	$\beta$ 3Gal-T 転写物の発現量 ( $\beta$ 3Gal-T/ $\beta$ -actin $\times 10^3$ )					
		$\beta$ 3Gal-T5	$\beta$ 3Gal-T1	$\beta$ 3Gal-T2	$\beta$ 3Gal-T3	$\beta$ 3Gal-T4	
Nama/wa-mock	<1	<0.01	<0.01	2.1	<0.01	<0.01	1.4
Nama/wa-3GT1	<1	<0.01	56	2.1	<0.01	<0.01	1.4
Nama/wa-3GT2	<1	<0.01	<0.01	38	<0.01	<0.01	1.4
Nama/wa-3GT3	<1	<0.01	<0.01	2.1	42	<0.01	1.4
Nama/wa-3GT4	<1	<0.01	<0.01	2.1	<0.01	<0.01	43
Nama/wa-3GT5	100	35	<0.01	2.1	<0.01	<0.01	1.4
HCT-3GT5L	18	5	<0.01	<0.01	2.2	<0.01	0.1
HCT-3GT5H	48	16	<0.01	<0.01	2.2	<0.01	0.1
Colo205	40	3.5	<0.01	<0.01	0.05	<0.01	4.6
SW1116	22	1.4	<0.01	0.3	0.6	<0.01	3.2
HCT-15	<1	<0.01	<0.01	<0.01	2.2	<0.01	0.1
Capan-2	23	1.2	<0.01	<0.01	1.9	<0.01	2.3
MKN45	<1	<0.01	0.04	0.5	66	<0.01	<0.01
PC-1	<1	<0.01	27	0.3	<0.01	<0.01	0.2

【0293】

発現プラスミドを導入した細胞では、対応する  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の転写量が、ベクターのみを導入した細胞に比較して増加していることが確認された。

一方、該形質転換細胞を溶液〔20 mM HEPES (pH 7.2)、2% Tr ironX-100〕に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。

【0294】

該細胞溶解液の蛋白質濃度は、マイクロBCA蛋白質アッセイ試薬キット (PI ERCE社) により測定した。

該細胞溶解液を用いて、 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を測定した。

ピリジルアミノ化した糖鎖基質の調製や活性測定は、既知の方法〔特開平6-181759、特開平06-823021、J. Biol. Chem. 269, 14730-14737 (1994)〕に準じて行った。

【0295】

具体的には、活性測定は、 $10\mu\text{l}$ のアッセイ溶液〔 $14\text{mM}$  HEPES (pH 7.4)、 $75\mu\text{M}$  UDP-Gal (SIGMA社)、 $11\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ 、 $0.01\%$  TrironX-100、 $25\mu\text{M}$  ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液〕中で $37^\circ\text{C}$ 、2時間反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生産物を同定することにより行った。

【0296】

基質としては、アミノピリジンで蛍光標識したラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose,  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ; 以下、LNnTと略記する) を $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理して末端のガラクトース残基を除去したもの (アガラクトLNnT,  $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ) を使用した。

【0297】

アガラクトLNnTは、約 $60\text{nmol}$ のアミノピリジンで蛍光標識したLNnTに対し、 $100$ ミリユニットの $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業) を加え、 $37^\circ\text{C}$ で $16$ 時間反応後、 $100^\circ\text{C}$ で $5$ 分間の熱処理により $\beta$ -ガラクトシダーゼを失活させることにより調製した。

【0298】

スタンダードとしては、アミノピリジンで蛍光標識したLNnTまたはアミノピリジンで蛍光標識したラクト-N-テトラオース (Lacto-N-tetraose,  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ; 以下、LNTと略記する) を用いた。LNnTおよびLNTはオックスフォード・グライコシステムズ社から購入した。オリゴ糖の蛍光標識は、常法〔Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)〕に従って行った。

【0299】

UDP-Gal (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応を行った後、HPLCで解析し、UDP-Gal を含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で3分間処理後、10,000×gで5分間遠心して上清を取得し、その一部をHPLCに供した。HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム(4.6×300mm;東ソー)を使用し、溶出液として0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.0)を用い、溶出温度25℃、流速1ml/分の条件で行った。

【0300】

生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920(日本分光)を用いて行った(励起波長320nm、放射波長400nm)。

生成物の同定は、スタンダードの糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。

【0301】

生成物の定量は、アミノピリジル化したラクトースをスタンダードとして用い、蛍光強度を比較することにより行った。

ヒトβ3Gal-T5の活性を100とした時の、各β1,3-ガラクトース転移酵素の相対活性を第3表に示す。

【0302】

ヒトβ3Gal-T5を発現させた細胞では明らかなβ1,3-ガラクトース転移酵素活性(LNT合成活性)が検出されたが、他のβ1,3-ガラクトース転移酵素を発現させた細胞では活性は検出されなかった。なお、コントロールプラスミド(pAMo)を導入した細胞でも活性は検出されなかった。

【0303】

各β1,3-ガラクトース転移酵素発現プラスミドを導入した細胞において、各β1,3-ガラクトース転移酵素転写物は同程度発現していることから(第3表)、ヒトβ3Gal-T5のGlcNAc β1,3-ガラクトース転移酵素活性(LNT合成活性)は他のGlcNAc β1,3-ガラクトース転移酵素(ヒトβ3Gal-T



1、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}2$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}3$ ) に比較して強いことが判明した。なお、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}4$  に関しては、GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性はなく、GalNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性を有することが知られている。

#### 【0304】

以上の結果、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  は GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素であることが証明された。また、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  の活性は他の GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素 (ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}1$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}2$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}3$ ) に比較して強いことから、LNT 等のタイプ 1 糖鎖の合成に有用であることが示された。

#### 【0305】

また、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$  転写産物の発現量と GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT 合成活性) が相関するかを検討するために、実施例 2 で取得した  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  発現プラスミドを導入した HCT-15 細胞 (HCT-3GT5L および HCT-3GT5H)、ならびに実施例 1 で使用した大腸癌細胞株 (Colo205、SW1116、HCT-15)、膵臓癌細胞株 (Capan-2)、胃癌細胞株 (MKN45) および肺癌細胞株 (PC-1) について、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$  転写産物の発現量と GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT 合成活性) を測定した。

#### 【0306】

各細胞における  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  転写産物の発現量は、実施例 1 または実施例 2 の (7) で記載した方法を用いて行った。GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT 合成活性) の測定は、上記の方法に従った。

結果を第 3 表に示す。

#### 【0307】

その結果、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$  転写産物の発現量と GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT 合成活性) が相関することが判明した。例えば、HCT-3GT5H における  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  転写物量は、HCT-3GT5L の約 3 倍であったが、HCT-3GT5H における GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT 合成活性) も HCT-3GT5L の約 3 倍であった。

## 【0308】

一方、PC-1では $\beta 3 \text{Gal-T}1$ を多く発現していたが、GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性（LNT合成活性）は検出されなかった。また、MKN45では $\beta 3 \text{Gal-T}3$ を多く発現していたが、GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性（LNT合成活性）は検出されなかった。

## 【0309】

以上の結果は、 $\beta 3 \text{Gal-T}1$ および $\beta 3 \text{Gal-T}3$ のGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性（LNT合成活性）は、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ に比較して弱いことを示しており、上記のNamalwa細胞を用いた結果と一致した。

## 【0310】

実施例4  $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 遺伝子の各種臓器での発現

実施例2の（7）と同様にして、RT-PCRを用いてヒト各組織（脳、肺、食道、胃（体）、胃（洞）、空腸、大腸、肝臓、脾臓、脾臓、腎臓、副腎、子宮、抹消リンパ球における $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 転写物の定量を行った。各組織における $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 遺伝子転写産物の量を、 $\beta$ -アクチンの転写産物の量を100とした時の相対値として表示した（図5）。

## 【0311】

$\beta 3 \text{Gal-T}5$ 転写物は、胃（体）、胃（洞）、空腸、大腸、脾臓で有意に発現していることが明らかになった。また、脳、食道、腎臓、子宮でも少し発現がみられた。一方、肺、肝臓、脾臓、副腎、抹消リンパ球では発現はみられなかった。

## 【0312】

実施例5  $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 染色体遺伝子の構造解析

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。したがって、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発

明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

【0313】

$\beta$ 3Gal-T5 cDNAの塩基配列（配列番号2）とGenome Project Databaseに登録されているDNA配列を比較した結果、登録番号AF064860の配列の一部に、 $\beta$ 3Gal-T5のcDNAの配列が含まれていたことより、 $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子はヒト染色体21q22.3に位置することが分かった。

【0314】

$\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域を明らかにする目的で、5' RACE法を用いて、Colo205細胞より $\beta$ 3Gal-T5 cDNAの5'末端領域の取得を行った。5' RACE法はキット（GIBCO社製5' RACEシステム、バージョン2.0）に従って行った。

【0315】

Colo205細胞由来のmRNA（1  $\mu$ g）を鋳型、配列番号22および配列番号23に示す配列を有する2種の合成DNAをプライマーとして、まず一本鎖cDNAを合成した。合成後、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、該cDNAの3'末端にオリゴdCを付加した後、キットに添付されているdGテイルを有する合成DNAをフォワードプライマー、配列番号24に示す配列を有する合成DNAをリバースプライマーとして、PCRを行った。

【0316】

PCRは、97℃で11分間の加熱後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル繰り返すの条件で行った。

増幅断片をHindIIIとSpeIで消化後、pBluescript SK(-)のHindIII-SpeI間にサブクローン化した。このようにして得られた5種のプラスミドについて塩基配列を決定した結果、Colo205細胞における $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子の転写開始点は上記の登録番号AF064860の配列上85153番目の塩基であることが明らかになった。

【0317】

したがって、これより上流の領域は、少なくともColo205細胞において機能しているプロモーター領域であることが判明した。

$\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域（転写制御領域を含む）は、転写開始点の上流の5 kb（配列番号3で表される塩基配列の1～5000番）と推定される。

【0318】

転写開始点の上流1 kb（配列番号3で表される塩基配列の4001～5000番）について、転写因子の結合配列のコンセンサス配列の存在について、TFSEARCH (transcription factor search) プログラム (Akiyama, Y. <http://www.rwcp.or.jp/lab/pdappl/papia.html>) を用いて解析した。

転写開始点の上流にTATAボックスは存在しなかったが、転写開始点の上流150 bp中に、2つのCdxAサイト、1つのAP-1サイト、1つのMZF-1(myeloid zinc finger 1 protein)サイトが存在すると推定された。

【0319】

該領域の下流にレポーター遺伝子を連結したプラスミドを、 $\beta$ 3Gal-T5を発現している細胞に導入し、レポーター遺伝子が発現するかどうかを検討することにより、プロモーター領域を実験的に特定することもできる。

$\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のエクソン領域とイントロン領域をさらに詳しく解析するために、PCR法を用いて $\beta$ 3Gal-T5 cDNAのアイソフォームが存在するかどうかについて検討した。

【0320】

実施例1で調製したColo205細胞由来の1本鎖cDNAを鋳型、配列番号22と配列番号25に示す配列を有する2種の合成DNAをプライマーとして、PCRを行った。

PCRは、97℃で11分間の加熱後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル繰り返す条件で行った。

【0321】

増幅断片をHindIIIで消化後、pBluescript SK(-)のHindIIIサイトにサブクローン化した。このようにして得られたプラスミドについて塩基配列を決定した結果、Colo205細胞において少なくとも5種類の $\beta$ 3Gal-T5 cDNAアイソフォームが存在することが明らかとなった(図6)。

#### 【0322】

各アイソフォームに相当するPCR増幅断片の量を比較することにより、各アイソフォームの発現量の比を求めたところ、アイソフォーム1が50%、アイソフォーム2が50%、アイソフォーム3、4、5はそれぞれ1%以下であった。各アイソフォームに相当するPCR増幅断片は、増幅断片の大きさと制限酵素処理(XbaI処理またはBsmI処理)により特定した。

#### 【0323】

以上の結果、 $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子は4つのエクソンと3つのイントロンよりなることが明らかとなった。 $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域(転写制御領域を含む)と $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子の配列を合わせて配列番号3に示した。 $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域(転写制御領域を含む)の配列は、配列番号3の1~5000bpである。 $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子の配列は、配列番号3の5001~10562bpである。 $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のエクソンとイントロンの位置を配列番号3の番号を用いて第4表に示した。第4表中において、大文字で示した塩基配列はエクソン部分、小文字で示した塩基配列はイントロン部分を示している。

#### 【0324】

$\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子の構造(エクソン領域とイントロン領域の位置と配列)と染色体上の位置、ならびに $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域の位置と配列は、本研究によって $\beta$ 3Gal-T5 cDNAの構造と機能が明らかになることにより、初めて特定できたものである。

【表 4】

第 4 表  $\beta$ 3Gal-T5 染色体遺伝子のエクソン-イントロン結合部位

エクソン 番号	配列番号 3 中の 塩基配列番号	長さ (bp)	スプライスアクセプター サイトの配列	スプライスドナー サイトの配列
exon1	5001-5273	273	————	CTGTCACGgtattttcc
exon1'	5001-5140	140	————	CCAAGCAGgttttctgg
exon2	5459-5567	109	ctctctagAGAACCCT	GTTTGGAGgttagggct
exon3	7427-7586	160	tttcctagTGATTCCT	AGCAAAAAGtgagttta
exon4	8234-10562	2329	cctttcagATGGCTTT	

## 【0325】

## 【発明の効果】

本発明により、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、タイプ 1 糖鎖の合成に関与する  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA が組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたタイプ 1 糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたタイプ 1 糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法、該 DNA あるいは該抗体を用いた大腸癌、膵臓癌、胃癌等の疾患の診断法、該 DNA、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質あるいは該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質を用いた大腸癌、膵臓癌、胃癌等の疾患の治療法を提供することができる。

## 【0326】

## 【配列表フリーテキスト】

配列番号 4 - 人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 6-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 7-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 8-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 9-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 10-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 11-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 12-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 13-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 14-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 15-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 16-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 17-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 18-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 19-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 20-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 21-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 22-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 23-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 24-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 25-人工配列の説明：合成DNA

【0327】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL PEPTIDE

<130> H10-2031N2

<140>

<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 3 2 8 】

<210> 1

<211> 310

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

---

Met Ala Phe Pro Lys Met Arg Leu Met Tyr Ile Cys Leu Leu Val Leu

1

5

10

15

Gly Ala Leu Cys Leu Tyr Phe Ser Met Tyr Ser Leu Asn Pro Phe Lys

20

25

30



Glu Gln Ser Phe Val Tyr Lys Lys Asp Gly Asn Phe Leu Lys Leu Pro  
35 40 45

Asp Thr Asp Cys Arg Gln Thr Pro Pro Phe Leu Val Leu Leu Val Thr  
50 55 60

Ser Ser His Lys Gln Leu Ala Glu Arg Met Ala Ile Arg Gln Thr Trp  
65 70 75 80

Gly Lys Glu Arg Met Val Lys Gly Lys Gln Leu Lys Thr Phe Phe Leu  
85 90 95

Leu Gly Thr Thr Ser Ser Ala Ala Glu Thr Lys Glu Val Asp Gln Glu  
100 105 110

Ser Gln Arg His Gly Asp Ile Ile Gln Lys Asp Phe Leu Asp Val Tyr  
115 120 125

Tyr Asn Leu Thr Leu Lys Thr Met Met Gly Ile Glu Trp Val His Arg  
130 135 140

Phe Cys Pro Gln Ala Ala Phe Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Met Phe  
145 150 155 160

Ile Asn Val Asp Tyr Leu Thr Glu Leu Leu Leu Lys Lys Asn Arg Thr  
165 170 175

Thr Arg Phe Phe Thr Gly Phe Leu Lys Leu Asn Glu Phe Pro Ile Arg  
180 185 190

Gln Pro Phe Ser Lys Trp Phe Val Ser Lys Ser Glu Tyr Pro Trp Asp

195

200

205

Arg Tyr Pro Pro Phe Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Val Phe Ser Gly Asp

210

215

220

Val Ala Ser Gln Val Tyr Asn Val Ser Lys Ser Val Pro Tyr Ile Lys

225

230

235

240

Leu Glu Asp Val Phe Val Gly Leu Cys Leu Glu Arg Leu Asn Ile Arg

245

250

255

Leu Glu Glu Leu His Ser Gln Pro Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg

260

265

270

Phe Ser Val Cys Leu Phe Arg Arg Ile Val Ala Cys His Phe Ile Lys

275

280

285

Pro Arg Thr Leu Leu Asp Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Arg Gly

290

295

300

---

Glu Asp Cys Pro Pro Val

305

310

【 0 3 2 9 】

<210> 2

<211> 2775

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (402)..(1331)

<400> 2

gtgaattcct ctttctctgc tggagctggg atattcttct tctcctgccc ttgacatca 60

gagctgcagg ctctctggcc ttggaccgcg aggatttata ccaagcaggt ttctgggttc 120

tcaggccttt ggccttggac tgatagttac accattggca tatctggttc tgaggctctt 180

ggtcttggac tgagccacac tcttggcatc ccagcgtctc cagcttgcac ggcctgtcac 240

gtgattcctg tcagaatcac catttttggg aaacaaacca agcccagaac ctgataatta 300

tggagcattc tacactgaca gtcttttgag acaaatttcc tcttggcatt tacactgtgg 360

ctttagcttt caaaccagag gtctctctta cccagcaaaa a atg gct ttc ccg aag 416

Met Ala Phe Pro Lys

1 5

atg aga ttg atg tat att tgc ctt ctg gtt ctg ggg gct ctt tgt ttg 464

Met Arg Leu Met Tyr Ile Cys Leu Leu Val Leu Gly Ala Leu Cys Leu

10 15 20

tat ttt agc atg tac agt cta aat cct ttc aaa gaa cag tcc ttt gtt 512

Tyr Phe Ser Met Tyr Ser Leu Asn Pro Phe Lys Glu Gln Ser Phe Val

25

30

35

tac aag aaa gac ggg aac ttc ctt aag ctc cca gat aca gac tgc agg 560

Tyr Lys Lys Asp Gly Asn Phe Leu Lys Leu Pro Asp Thr Asp Cys Arg

40

45

50

cag aca cct ccc ttc ctc gtc ctg ctg gtg acc tca tcc cac aaa cag 608

Gln Thr Pro Pro Phe Leu Val Leu Leu Val Thr Ser Ser His Lys Gln

55

60

65

ttg gct gag cgc atg gcc atc cgg cag acg tgg ggg aaa gag agg atg 656

Leu Ala Glu Arg Met Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Lys Glu Arg Met

70

75

80

85

gtg aag gga aag cag ctg aag aca ttc ttc ctc ctg ggg acc acc agc 704

Val Lys Gly Lys Gln Leu Lys Thr Phe Phe Leu Leu Gly Thr Thr Ser

90

95

100

agt gca gcg gaa acg aaa gag gtg gac cag gag agc cag cga cac ggg 752

Ser Ala Ala Glu Thr Lys Glu Val Asp Gln Glu Ser Gln Arg His Gly

105

110

115

gac att atc cag aag gat ttc cta gac gtc tat tac aat ctg acc ctg 800

Asp Ile Ile Gln Lys Asp Phe Leu Asp Val Tyr Tyr Asn Leu Thr Leu

120

125

130

aag acc atg atg ggc ata gaa tgg gtc cat cgc ttt tgt cct cag gcg 848

Lys Thr Met Met Gly Ile Glu Trp Val His Arg Phe Cys Pro Gln Ala

135	140	145	
gcg ttt gtg atg aaa aca gac tca gac atg ttc atc aat gtt gac tat	896		
Ala Phe Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Met Phe Ile Asn Val Asp Tyr			
150	155	160	165
ctg act gaa ctg ctt ctg aag aaa aac aga aca acc agg ttt ttc act	944		
Leu Thr Glu Leu Leu Leu Lys Lys Asn Arg Thr Thr Arg Phe Phe Thr			
170	175	180	
ggc ttc ttg aaa ctc aat gag ttt ccc atc agg cag cca ttc agc aag	992		
Gly Phe Leu Lys Leu Asn Glu Phe Pro Ile Arg Gln Pro Phe Ser Lys			
185	190	195	
tgg ttt gtc agt aaa tct gaa tat ccg tgg gac agg tac cca cca ttc	1040		
Trp Phe Val Ser Lys Ser Glu Tyr Pro Trp Asp Arg Tyr Pro Pro Phe			
200	205	210	
tgc tcc ggc acc ggc tac gtg ttt tct ggc gac gtg gcg agt cag gtg	1088		
Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Val Phe Ser Gly Asp Val Ala Ser Gln Val			
215	220	225	
<hr/>			
tac aat gtc tcc aag agc gtc cca tac att aaa ctg gaa gac gtg ttt	1136		
Tyr Asn Val Ser Lys Ser Val Pro Tyr Ile Lys Leu Glu Asp Val Phe			
230	235	240	245
gtg ggg ctc tgc ctc gaa agg ctg aac atc aga ttg gag gag ctc cac	1184		
Val Gly Leu Cys Leu Glu Arg Leu Asn Ile Arg Leu Glu Glu Leu His			
250	255	260	

tcc cag ccg acc ttt ttt cca ggg ggc tta cgc ttc tcc gta tgc ctc 1232

Ser Gln Pro Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg Phe Ser Val Cys Leu

265

270

275

ttc agg agg atc gtg gcc tgc cac ttc atc aag cct cgg act ctc ttg 1280

Phe Arg Arg Ile Val Ala Cys His Phe Ile Lys Pro Arg Thr Leu Leu

280

285

290

gac tac tgg cag gct cta gag aat tcc cgg ggg gaa gat tgt ccg cct 1328

Asp Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Arg Gly Glu Asp Cys Pro Pro

295

300

305

gtc tgaggggagc ccagaggcac atccggacaa gtttcagata acccgtgggg 1381

Val

310

atagtttttg ctagattttg gaagaggggg cgggacagag gatgctgttc ttcagtgtg 1441

aaatccacgc cagaatgtcg gtgttcacga agtcactgat tagttccac ttggtgcccc 1501

aggcaataat aggcccgtct cttgggcacg cacactcttc atactaagtg tttgacatac 1561

acctggattt ttgcatttca ggggtcagta tcctatgaca tgatgggtgt taccatccta 1621

attttacagg caaggacaca gcagctgcga gaggtacaga aacttgtccc aaggctcaca 1681

gccagtaggc ataggagcgg gaatgaaaat cgagcactgt cagaatctgg tgggcagccc 1741

ctgacttgaa ccactccac gtgctgcctc ccttaggagg ggacactgat gatgaggtct 1801

cggagccggc atccttccat ccctgtcgag tcccctccac ctcagctccc agtccttggtg 1861

ctttttggag ctaagcctgg gatgaccaa ttcaccccag ctccttcatt cacagggtg 1921

gatgtagctg ggattgagtc catgttatcg gctcgggtact caacacaacc caagtttcat 1981

ccgaggaaat gtccccgcag tggatgcagc tcacatgctg aggaacaccc agctctggac 2041

agagttctta taaatgtata aattaggctc agaaaccact gcattctgac ctgctgtaca 2101

gactgcccac actgctgacc tgcctagcga gcaggacatc cttctgagc catctgctgc 2161

tctctcattt catcaccca actgtccctt gtttttgatc aatggggacc agccactgcc 2221

ccaggagcac tttagggtc tcagttcaaa ctgaaggaca gttgaactca gatgggggtc 2281

atgtgggatt ctgggagctt tctgggaatt cagtggagt caagtcagga tgctctcaag 2341

gacccctcgg gctcagagcc ctaaagtggg ccctggtgaa gcagggtggt cctgcgtcca 2401

~~cttcccaagc ctgagccaag ctcacttca ttgaatgtct catttggecg aggaacaact 2461~~

gaactttgtg gtttgctgtt tagccttcag tttgctccgc tgccctctac ccagaggttt 2521

gtgcgagcct gtgttcagg gttgtataaa accaaggtac ttcgttagtt ttgccattc 2581

agccatggtc acgtgacatg caaagtaatc ttgctcctaa ttatagaaat gatttttctt 2641

ttaatttttt actttaccag actttacttt gtactcagag aagaggcctc acatggctgt 2701

gtcacatata aatgttggac taaactctta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2761

aaaaaaaaaa aaaa

2775

【 0 3 3 0 】

<210> 3

<211> 10562

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(5000)

<220>

<221> exon

<222> (5001)..(5140)

---

<220>

<221> exon

<222> (5001)..(5273)

<220>

<221> exon

<222> (5459)..(5567)



<220>

<221> exon

<222> (7427)..(7586)

<220>

<221> exon

<222> (8234)..(10562)

<400> 3

cgccctctggc aaggttagacc ttgaaggcaa aactgagttg aggtttgtta ggacggaaat 60

aattactgct gggcatgcag cacttcccaa cgttctgtg aggcaggcag tgttattgcc 120

agtttggcac aagggcacag gtgtagaaca cgtaagtgcc ctgggccgtg ctacaccacc 180

actgtgtttg agctgagatg tgaaccaggg ccttctgatt ccaaattcct cattcctttc 240

atcctagcag gctgcctgcg gttagcagaa ggggactcct gtatctgctc tgcagcttct 300

tcagctgatt tataatggaa aacagagtag atattgattt ggcaattagt gaaatattat 360

gagaatcatt atagcaaact tcacagtttg atcaaggatc ctgccttcaa tatctggcca 420

actgatgtgt aaaagcagct gcaagaactt cagagctgac aaaaaagca aactccagac 480

tttatttcct ggaatctgtt ttgtgagaca ctggcccatg aaatgctctc ccagaaatag 540

tcggatttgt ggtcaaataa atttgggcaa ttctacagaa catgtgtctt tttcagagat 600

ttatttttaa ttaaacttat ttaaaaatat taacatggta caatttgcac atagtgaagt 660

gtgcaaactc tcgctacatg gctcaatgag tttttacata tatttccacc catgtaatca 720

ccaccgagat ctagaataga atgtattcgt ctctccagag gttcctctgt tcccttgcag 780

tcaataattc tccaccaaag ataaacattc tgcigacttc cttcatcatt gataagtttt 840

tcctggtttt gaacttcata taaatggaat catttcatgt ctagctcttt tcactcaaca 900

taacatctgt cagattaata catcgcatgt caatagtttg tagtttttat ggctgtgtag 960

catttcattc attcattctg ctgttgatgg aaatttcttg actagagttg tgttatcaat 1020

ttattgcctc ttggctccaa attcaccctt ttigcctggc ctctggaaat gggctctgggc 1080

cctctaaata ttttcccttt gcaatctggc tcttgaagct tatcagtga gggctctgga 1140

ggggcattgc aggggaaaca gtttttctt cctggttcag ggacgctggc ttggtagccc 1200

ctgtggtggt acaggagtac ttggcaagac agcagtctcc ccgggtacac ccgctagggtg 1260

ttttgtagca gaggatcatc gtgagacaac tggatgaactg ctttccctgc aacctagagg 1320

gcagatttct ggcaagtctc agagggtgga ttccaaacat gttcctctaa tgtggatctg 1380

cagtgatgtc tctgccattc agtgggcata gctgtgccct tttagtgggg tctagatctc 1440

agccctggga ttgggggcat tttctcagtt gctcaatctc agccctaggg gcagtgacca	1500
ttccttatat atggttggtt gtatatctt ttggaactgtc ttgattttat tactgttagt	1560
ctctcattac tccactccct tattatagta aatgattctt tgtatttgac tttccctggt	1620
caaggtacta agtgggtttt ctctcctggt ttgatctaga ttgatacaat aattttttgc	1680
aattatgagc aatgctgctg tgaacattct tgatcatgtc ttagtggaca taagcaataa	1740
ttgctgctgg gtctgtgtgc aggaatgatt tgctagatca tagcacatac gtttatctgt	1800
agcagaaact gccaaaggtat atacagcttt ccaaagtgtg ttaatttaca tgcctgctag	1860
caaggtagga gaaatacagt tgcttcccaa gtagctggga ttacagggtg gtgccaccac	1920
tcctggctaa tttttgtag agatagggtt ttgccatggt ggccaggcta gtcttgaact	1980
gctggcctca agtgatctgc ctgccttggg ctcccaaagt gctaggatta cagggatgag	2040
ccaccatggt cgacttcatg ataaaacttc agtggatgag gagctgcctc ttatgatgaa	2100
caaagaaggt ggtttcttga aatggaatct actcctgggt aagatgctgt gaacattgtt	2160
gaaatgacaa gaaagaattt acagtgttac atagagttag ttgatgaagc agtagcagga	2220
ttcgagagga tcgattccaa tttcaaaata agttcttctg tgggtaaaat gctatcaa	2280
ggcgtcgc at gctacagaga aatctatcat gaaaggaaga gtcaattgat gtggcaaact	2340

tcattgttgt cgtattttta gaaattgtca ggaccacccc aaccttcaac aaccatgacc 2400

ctgatcagtc aggagccatc cacattgagg cgagaacctc cagcagtaaa aagattatga 2460

ttctctaaag gatcagatga acattagcat ttttttaagc aataaagtat ttttacgtaa 2520

gatatgtatg ttatttttta ggcataatgc tattatgcat ttaatagact ccagtatatt 2580

gtaaacataa ctttaaagtc actgggagat aaaagtatgt gctcttttat gatatttgct 2640

ttattgcagt agtctgtaat ggaaactaca ttatctcttg ggtacacctg tatacagaaa 2700

gaaatttatc atgaggaaat gctcatgcaa tgatggaggc tggaaagtcc caagatctgc 2760

agtcagcaag ttggagaccc atgagagtcg atggigtggc cccagtctgt gtttgaaggc 2820

ctgagaacca ggagagccaa aagctggcaa gctctggacc caggaagagc tgatgtttca 2880

gttcaagtcc gaaggcagga aaagactgaa ggcccagctc caggcagtca ggcaggagaa 2940

ctttcctttt actcacgaga gggtcagcat ttgtttctgt tcaggctgtc aactgagtga 3000

cccagaaaag ctggcacata acattcacca tcgtgctgca agagctgcaa aacctctctt 3060

gcttctaaca ctgatgetca gccacacctc agtgggcagg gagctgggtg ccgggaggac 3120

ttggggttgc cagcccagtg tgggcctgga cagttgctga gaatctccct ccgccctgtg 3180

acttcttaat tacttagagg gtcaccctgg ttgctcactt cagctcactt gggagattct 3240

ctctgcttga ggccaggggt aggtccaggt ctgatgggggt ctgaagctta tacaattggg 3300

gtggggggca ttcctcttta aggaaaagaa aacagcagag gtgagtcgtc ctgcagctta 3360

gcttcactag tctcgtggaa aatttgcctc ctaaaatgtc tttcctctga gaaagcccag 3420

gcctccaaag gccagccag gctggcgtca gtctggggtc agctgcgggg aggtccagg 3480

ccatgtgtga cacgggagtt taccatcc cagtttccag tggagaagca tcgttctcgt 3540

ccacccccgt catgctcttt tccaccttct ccagggaag ggatatttcc agtctgtaca 3600

acgaatccac tgaaatgta aggtgggcac agtggctctgg ggtcttcgac ctgtttata 3660

cgtgggtcct gttactggtc ggtctgtac aggcagtttc cactggcggt tttaccagg 3720

ccagcctaga gtagaatgac cgcagttaa aatatagatt cctgggcccc agacctgcca 3780

gaatctctgt gagatggaac cttcaacct gggttttaaa caagcctccc gggtgattct 3840

---

~~gacactcact ggatttgaga accgtgggggt tgttcagaca gcagggaegt tgatgttgtt 3900~~

ccttctgcgt tcctgggtgat gctgttctgt tctccaagg cctatgcggt ggtgagaatc 3960

tccaaggata caagacagtg atctggagcg agtgtcctga aagcagactc tagcactcag 4020

gactgccaac accctccccg gggttccctg gtctggaatt cccatcccct ggttccacct 4080

gttacatcac acctccccctt caaggaccag tgcagatgcc acgtccttica cggggctcag 4140

aatgctcacc agcttccctct ccaccgaggg ccacagcccc tggagacccc ttgagctgag 4200

tgctttgtcc ttgcatactc tttctggcct catagtgggg cttggccatt gtcccttcac 4260

tccagatctc tcctttcagg tccaggaagt gcactctgaa cttactttc cagaccccc 4320

cttcagtttt ccagtcctta gagagggtga cttctgattc ctttgtctct gtgccctgta 4380

gcctcaggtc aggcttaagg caaggctctc tcacctggcc tggggagagt cccaggacgc 4440

tgcacgtgcc tgtgcgggta ggatgctgat gccagattt cccgttagag agcctttccc 4500

tatcctgacg gctctagctt tgtgtgttac ttacttggtc cactttaatt caaaatgtac 4560

ccagcaacca gcttgtgcac agttctctgg ggtttcagga gggatgtaag acatacccct 4620

tgcccttcag gcactatggc cagaaggggg gcagtgcctt aggcagaggg cgggagccag 4680

cagatgggat acactcagag gagcctgcag caggcagagg cagaggagaa gggaggtcta 4740

cacgttctgc actgtattta tctccttcag ttccaagggt cttctcctggc atctatattg 4800

ctcatgagtt acagagcaaa gcctgggtgtg atggttactt ttaggtgtca acttggctgg 4860

attaataaat acctagagaa ctggtaaagc attatttctg ggtgtgtttg tgaagggtgtt 4920

tccagaggag attggctgtg agtcagtggg ctgagtgggg aggagctgcc ctccatgtgg 4980

gcaggcacca tccattgact gggcccagat agaacaagaa ggcagaagaa atgtgaattc 5040

ctctttctct gctggagctg ggatattcct ctctcctgc ccttggacat cagagctgca 5100

ggctctctgg cctttggacc cgaggattta taccaagcag gtttctgggt tctcaggcct 5160

ttggccttgg actgatagtt acaccattgg catacttgggt tctgaggctc ttggtcttgg 5220

actgagccac actcctggca tcccagcgtc tccagcttgc atggcctgtc acggtatttc 5280

ccaacctccg taatcacgct agccaattct tctaagaaat ttcttctcat ctatctgtct 5340

gtctatctat ctatctgtct acctaccgac ttacctacct acctgcctat ctatcttttg 5400

attaatctac ctatcaatct ttctatctat ccataacctg ttgattcgat ctctctagag 5460

aacctgact aatacacctg gagtgcagaa tctgctggag aaactgccat tccgttattg 5520

actggctgggt caggccatac agcctgggtg tctagatgtg tttggaggta gggcttctgt 5580

~~agcacagata gtgcctgttc atggctctgt cccaggtaag gcagagctag cttgtgctga 5640~~

gggcttctgc tttgcagctg gcctgggggtg gctaggatct ggggacacag gctgcccttt 5700

ccaggctctg tctgctgggtg ctgcagggtc ccctacctcc tcttcagtg gaaggctggc 5760

ccccaggctc tctttaggcc caatacagac tcagccaaag atgcagatgt ctcatatag 5820

aggattctga gcttgactt ctggtggtaa ctccacttta ggcaggaaaa atgttcaact 5880

gcccatgaaa acaaatgacc ccgggtcatt tgggtttggc acctgctctg ccagttgggt 5940

ttggcacctg ctctgcctcc tgggaaacag ttiggccaat gcactgcatg aggtgagcgc 6000

ccatccctgg gaatttagag ccctgtgaag ggtcctgagg agaggcacat cagagagaat 6060

gagaatttaa ggtttactgt taaagcaacc catagaaaag gagcagaatt attcaagcaa 6120

ggaaacaaag tagaaaaata tcttctttcc ctigcacttg gtttttatgt ttctctctaa 6180

aatgtattgt gggggagaaa gcagtccccc aaccccccta atcagctgca tatcttagcc 6240

atgcaaataa ataatgaaag agagaaagaa ggagagaaag agaaagaaaa gtaaaggaag 6300

gaaggagaga aggaaggaaa gaaagaaaag aaagaaagaa actttgcagc atcctggagc 6360

accagttcag acaagtictg gtctcctgct tgccttctgc tgtgatttct ctgaagttgc 6420

tgggggcagg agctgggcag gaactcccca ggggtgccaa gcagagcagg tagttggcta 6480

agtttgctc caggaaagaa gtccctggag agcgagctgg ttctagaaag ctccattatt 6540

atattcctat tgcttttggc gaatatatgt agaacagaat ttigacaatg aaattttcag 6600

gtgctctttt ggccatcaaa ataaccagct ctgggctggg cacagtggct tgcccttgta 6660



attccagtgt tttgggaggc caaggcaggg gactgcgtga gccagaggat ttgagactag 6720

cctgggcaac atagtgaac cccatctcta caaaaaatac aaagttagaa gagtatggtg 6780

gcatgcgcct gtggtcacag ctacttggga agctgtgacc caagtcacag gaggatcgct 6840

tgagcccagg agttcagggc tgtagtgagc tatgattgtg ctactgtgct ccagcctggg 6900

agacagagtg acatcaggtc tctgaaatat taaaattaaa aagcccaaac caactctgct 6960

tttcaactctt tcagtttcat ttcttgcgtg cctctctgtc ctctcaccca gggtaacatt 7020

tttaaagtgc cgctattgtg ttaagaattg gatttattct ctgtgtttaa ttctctcagc 7080

attaactaca gactctgtta tgtaaataag gtaaattatc aggatgagaa gtgagactct 7140

aatttatgag tttatcatgt ctcttttaaaa agctgctagg tgctatccta acttattagg 7200

cttgaaggat tctgggggat tggcatattg ttactgttgt ggacttttgt tgccttgatc 7260

ataccatttt tacagatgag aaaagtgagg ctgggattgg ggctcaaagt cgtgctcaga 7320

~~gtcacataag taggttgaa ggtgacgcta cagacacggt aaattgtgaa ggcctgettg 7380~~

taaggcacga gtgatttgaa tgacactctt tttttttttt tcctagtgat tcctgtcaga 7440

atcaccatttt ttggtaaaca aaccaagccc agaacctgat aattatggag cattctacac 7500

tgacagtict ttgagacaaa tttcctcttg gcatttacac tgtggcttta gctttcaaac 7560

cagaggttcc tcttaccag caaaaagtga gttatacgct ttcttaatgt tataacgtta	7620
ccatggatga tcctgaactt gccgaggata gcagagacgg gtgggcagaa caggaaagaa	7680
tcagatcaga gactgtaaaa agtaacttaa aaaaaataa ttctggcaga gacagaattt	7740
gaaggtactt gtgcacatca gaacactgga cttgcttttt tctgggagca ggaatgctgc	7800
ttaattagat cagagaagaa tgcaagtggc ccatacattt agatctacaa tgcgtgggtt	7860
ccagacctgc agcttgtttt gctgcgcttc atcatggagt catagaaggc cagagctgga	7920
ggaccgagtg agggacctgg tgccatatcc ctacagacag gcaatggag actcccgtag	7980
gttaagggtc gcagagcctg gaccaatgcc cagaatctct gagcttttta tcttacacca	8040
tgaagtgaca gatgctggca gatgttagac ctttgtgctt aactgtttta ccacacagca	8100
cccgacttct gtatgcagcg aggttctaga gtttcaaaa cacgggtctc ctctcccacc	8160
tcagcttctt agcataaaac tagacacatc ctcatgcttt tgaggcttaa tcattggatt	8220
ttgttccttt cagatggctt tcccgaagat gagattgatg tatatttgcc ttctggttct	8280
gggggtcttt tgtttgtatt ttagcatgta cagtctaaat cctttcaaag aacagtcctt	8340
tgtttacaag aaagacggga acttccttaa gctcccagat acagactgca ggcagacacc	8400

tgaagtcact gattagtcc cacttggc cccaggcaat aataggcccg tctcttgggc 9360

acgcacactc ttcatactaa ggtttgaca tacacctgga tttttgcatt tcaggggtca 9420

gtatcctatg acatgatggg tgttaccatc ctaattttac aggcaaggac acagcagctg 9480

cgagaggtac agaaacttgt cccaaggctc acagccagta ggcataggag cgggaatgaa 9540

aatcgagcac tgcagaatc tgggtggcag cccctgactt gaaccactcc cacgtgctgc 9600

ctcccttagg aggggacact gatgatgagg tctcggagcc ggcatccttc catccctgtc 9660

gagtcacctc cacctcagct cccagtcctt gtgctttttg gagctaagcc tgggatgacc 9720

aaattcaccc cagctccttc attcacaggg ctggatgtag ctgggattga gtccatgtta 9780

tcggctcggt actcaacaca acccaagttt catccgagga aatgtccccc cagtggatgc 9840

agctcacatg ctgaggaaca cccagctctg gacagagttc ttataaatgt ataaattagg 9900

ctcagaaacc actgcattct gacctgctgt acagactgcc cacactgctg acctgcctag 9960

cgagcaggac atcccttctg agccatctgc tgctctctca ttcatcacc ccaactgtcc 10020

cttgtttttg atcaatgggg accagccact gcccaggag cactttaggg ctctcagttc 10080

aaactgaagg acagttgaac tcagatgggg ttcatgtggg attctgggag ctttctggga 10140

attcagttgg agtcaagtca ggatgctctc aaggaccctt cgggctcaga gccctaaagt 10200

gggccctggg gaagcagggt ggtcctgcgt ccacttccca agcctgagcc aagctcatct 10260

tcattgaatg tctcatttgg ccgaggaaca actgaacttt gtggtttgct gtttagcctt 10320

cagtttgctc cgctgcctcc taccagagg tttgtgcgag cctgtgttgc agggttgtat 10380

aaaaccaagg tacttcgtta gttttgccca ttcagccatg gtcacgtgac atgcaaagta 10440

atcttgctcc taattataga aatgattttt cttttaattt ttactttac cagactttac 10500

tttgtactca gagaagaggc ctcacatggc tgtgtcacat ataaatgttg gactaaactc 10560

tt 10562

【 0 3 3 1 】

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

ttcagccacc taacagttgc cagg

24

【 0 3 3 2 】

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

ataccttctt cgtggcttgg tggag

25

【 0 3 3 3 】

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

---

<400> 6

tagaagctag aagagctatt cggc

24

【 0 3 3 4 】

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

actcgccagt gattgaacac aaac

24

【 0 3 3 5 】

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

cccaatgccca agtacgtaat gaag

24

【 0 3 3 6 】

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

tgtggtgttc cttagcatga cctg

24

【 0 3 3 7 】

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

ttgatcccca accaggaagc ttgc

24

---

【 0 3 3 8 】

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

tgaggccact gctcctctga tacg

24

【 0 3 3 9 】

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

gatatcgccg cgctcgtcgt cgac

24

【 0 3 4 0 】

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13



caggaaggaa ggctggaaga gtgc

24

【 0 3 4 1 】

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

ctttagagca c

11

【 0 3 4 2 】

<210> 15

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15

ctctaaag

8

【 0 3 4 3 】

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

gcnathmgnc aracntgggg

20

【 0 3 4 4 】

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (21)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

---

<400> 17

taygtnatga aracngaytc ngay

24

【 0 3 4 5 】

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (19)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

rtcrctrctn gtyttcatna crta

24

[0 3 4 6]

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (4)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (16)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

rcanarnccn acrtanacrt cytc

24

【 0 3 4 7 】

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

accaccagca gtgcagcgga aac

23

【 0 3 4 8 】

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

gccacgatcc tcctgaagag gca

23

【 0 3 4 9 】

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22

ctaagcttga aaggatttag actgtacatg c

31

【 0 3 5 0 】

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 23

ctaagcttgt ctgcctgcag tctgtatctg g

31

【 0 3 5 1 】

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24

ctaagcttga caggccatgc aagctggag

29

## 【 0 3 5 2 】

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 25

ctaagcttgt gaattcctct ttctctgctg

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 の A は、各種ヒト癌細胞株におけるタイプ 1 糖鎖（シアリルルイス a 糖鎖、ルイス a 糖鎖、ルイス b 糖鎖）の発現量を測定した結果を示した図である。各細胞を抗シアリルルイス a 糖鎖抗体（19-9）、抗ルイス a 糖鎖抗体（7LE）、または抗ルイス b 糖鎖抗体（Neokokusai）で蛍光抗体染色した後、FACS を用いて解析した。各抗体との反応性が強い順に+++、++、+、±、-で示した。-は抗体との反応性がなかったことを示している。NTは解析していないことを意味している。

図 1 の B は、定量的PCR法を用いて、各種ヒト癌細胞株におけるヒトβ3Gal-T1、ヒトβ3Gal-T2、ヒトβ3Gal-T3およびヒトβ3Gal-T4の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各種細胞株における各β1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられるβ-アクチンの転写産物の量を1000と



した時の相対値として表示した。

【図2】

図2は、プラスミド pBS-3GT5 の造成工程を示した図である。

【図3】

図3のAは、コントロールプラスミド (pAMo) を導入したNamalwa細胞 [Namalwa(mock)]、あるいはヒト  $\beta$ 3Gal-T5 発現プラスミド (pAMo-3GT5) を導入したNamalwa細胞 (Namalwa-3GT5) について、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、DU-PAN-2の代わりにA-PBSを用いた時の結果である。

図3のBは、コントロールプラスミド (pAMo) を導入したHCT-15細胞 [HCT15(mock)]、あるいはヒト  $\beta$ 3Gal-T5 発現プラスミド (pAMo-3GT5) を導入したHCT-15細胞 (HCT-3GT5H) について、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体 (19-9)、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2)、抗ルイス a 糖鎖抗体 (7LE) または抗ルイス b 糖鎖抗体 (Neokokusai) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、DU-PAN-2の代わりにA-PBSを用いた時の結果である。

【図4】

図4のAは、定量的PCR法を用いて、各種ヒト癌細胞株におけるヒト  $\beta$ 3Gal-T5 の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各種細胞株におけるヒト  $\beta$ 3Gal-T5 の転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる  $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した。

---

図4のBは、ウェスタン・ブロッティング解析により、各種ヒト癌細胞株におけるCA19-9抗原含有タンパク質の発現を調べた結果を示した図である。

【図5】

図5は、定量的PCR法を用いて、各種ヒト組織におけるヒト  $\beta$ 3Gal-T5 の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各組織におけるヒト  $\beta$ 3Gal-T5 の転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考え

えられる $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した。

【図6】

図6のAは、ヒト $\beta 3 \text{ Gal-T5}$ 染色体遺伝子の構造を示した図である。4つのエクソンは四角で、イントロンは線で示してある。エクソン2中にはXbaIサイトが、エクソン3中にはBsmIサイトが存在している。コーディング領域 (open reading frame) は、斜線で示してある。ヒト $\beta 3 \text{ Gal-T5 cDNA}$ のアイソフォームの解析に使用したプライマー (si-1、si-2、si-3、si-4) の位置を矢印で示した。

図6のBは、ヒト $\beta 3 \text{ Gal-T5 cDNA}$ のアイソフォームの構造を示した図である。存在比は、Colo205細胞における各アイソフォームの発現量をパーセンテージで示したものである。

図6のCは、RT-PCR法を用いて、Colo205細胞におけるヒト $\beta 3 \text{ Gal-T5 cDNA}$ の各アイソフォームの発現量を調べた結果を示した図である。図6Aに示したプライマーの組み合わせでRT-PCRを行った後、図中に示した制限酵素 (XbaIまたはBsmI) で切断してアイソフォームの特定を行った。noneは制限酵素処理をしないことを意味している。左のレーンは分子量マーカー (100bpラダー) である。

特平 1 1 - 0 4 7 5 7 1

【書類名】

図面

【図1】

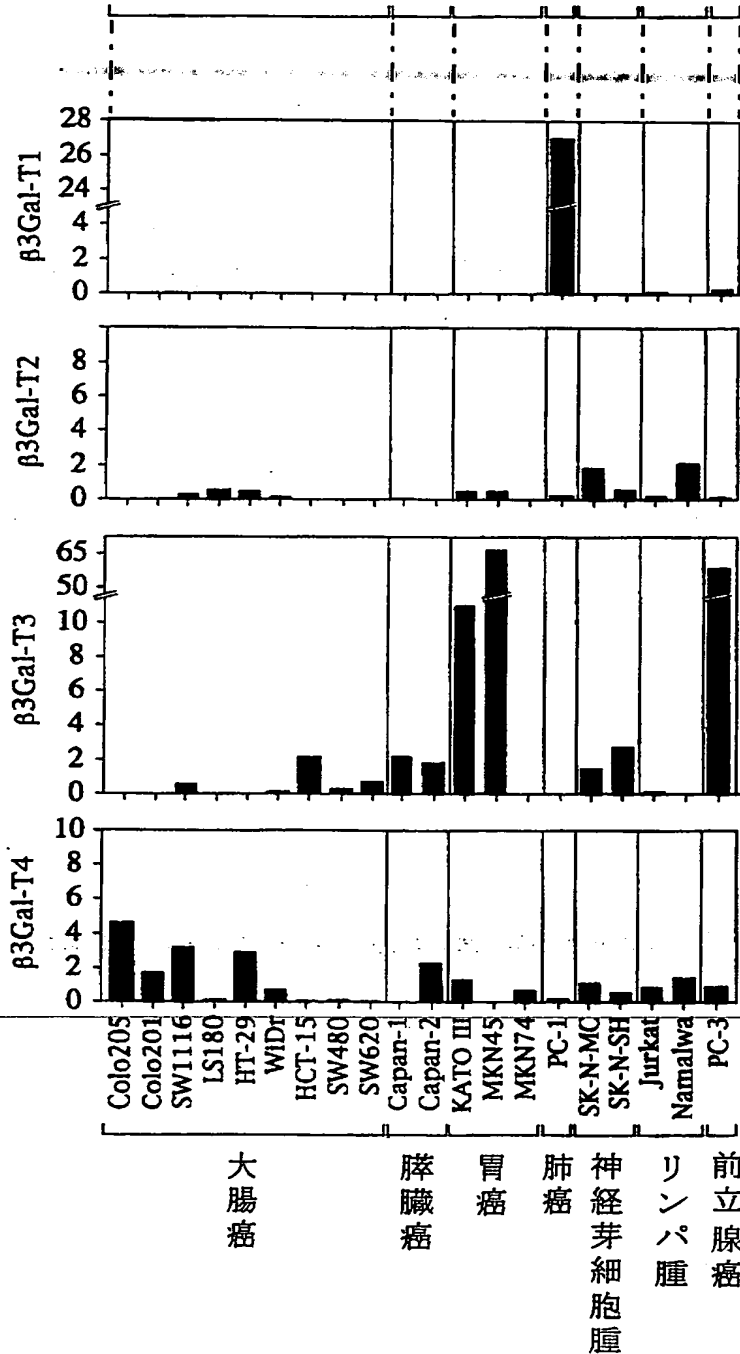
A

Flow cytometry

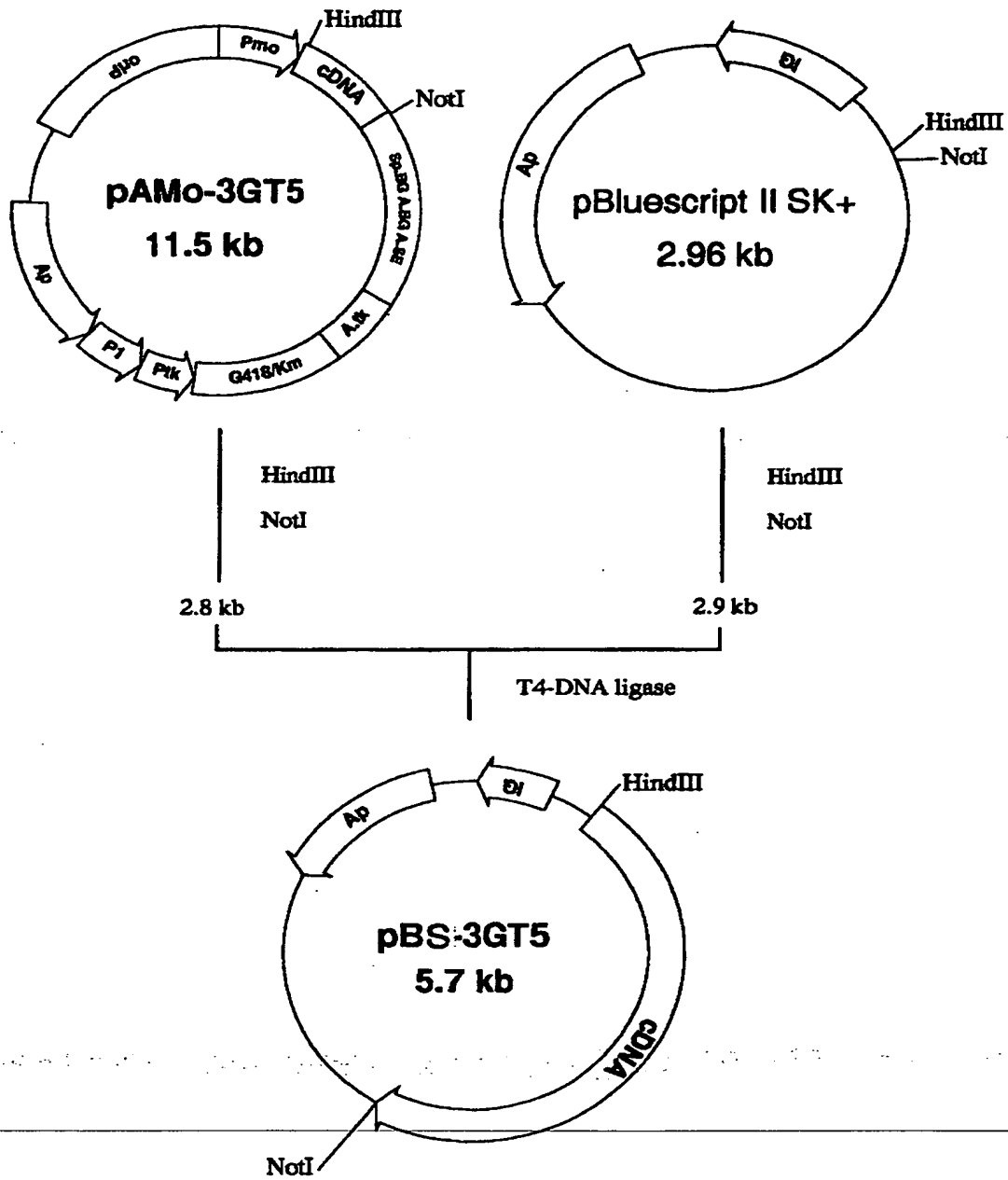
sLe<sup>a</sup>(19-9)    ### + ± ± - - - - - # ± - - - NTNTNT - -  
 Le<sup>a</sup>(7LE)    ### ± ± ± ± ++ - - - ± - - NTNTNTNT - -  
 Le<sup>b</sup>(TT42)    ### ## + ± ± + - - - ± - - NTNTNTNT - -

B

β 3 Gal-T 転写産物の相対量  
 (β3Gal-T/β-actin × 10<sup>3</sup>)

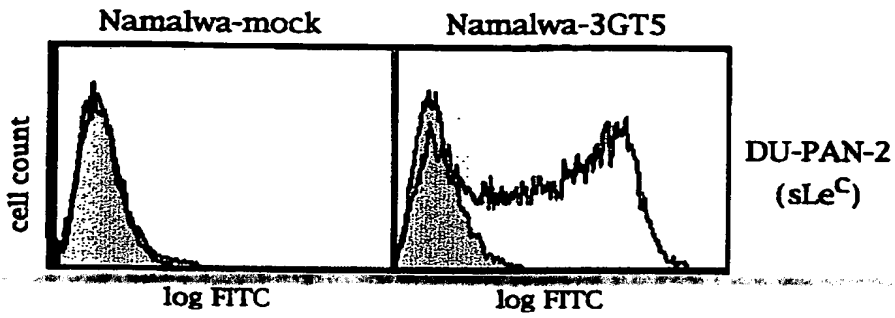


【図 2】

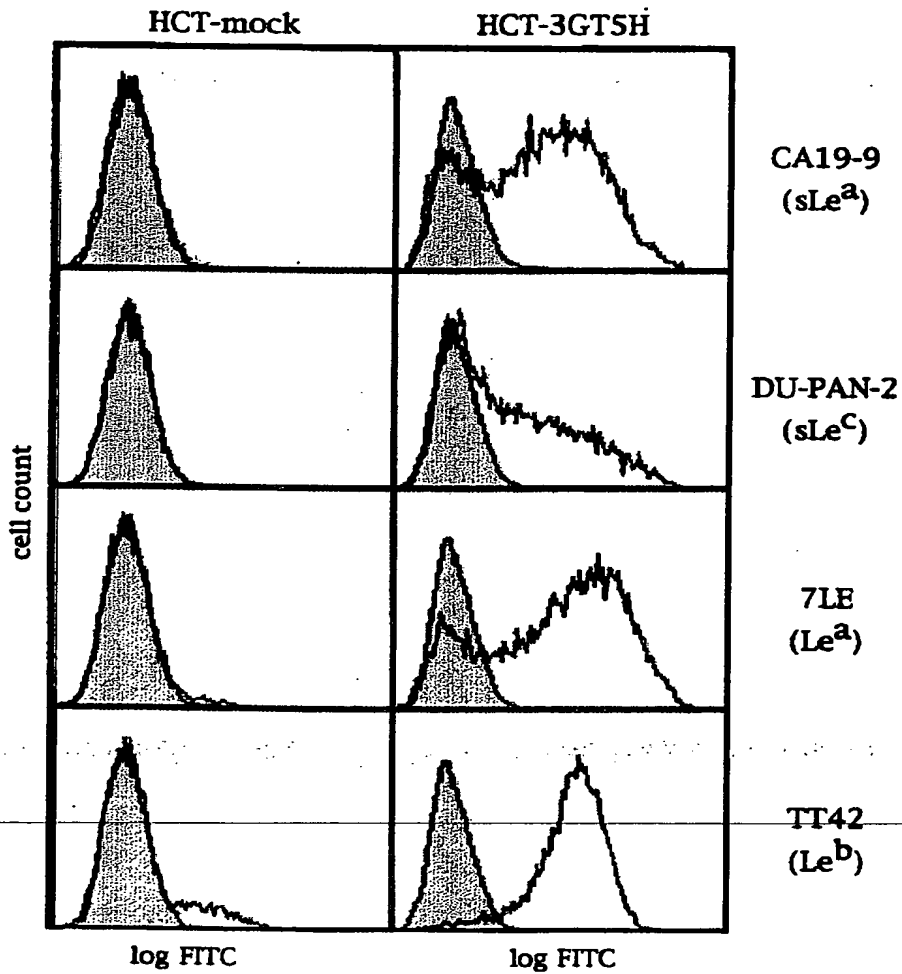


【図 3】

A

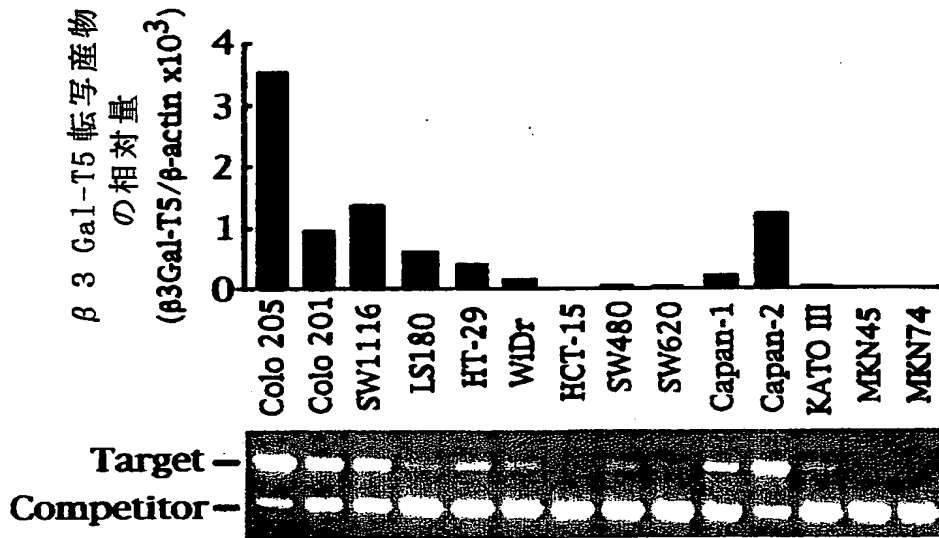


B

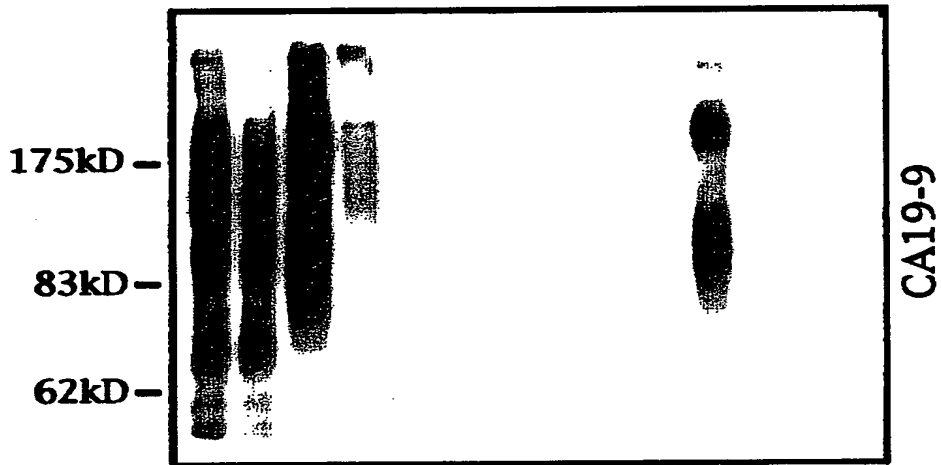


【図4】

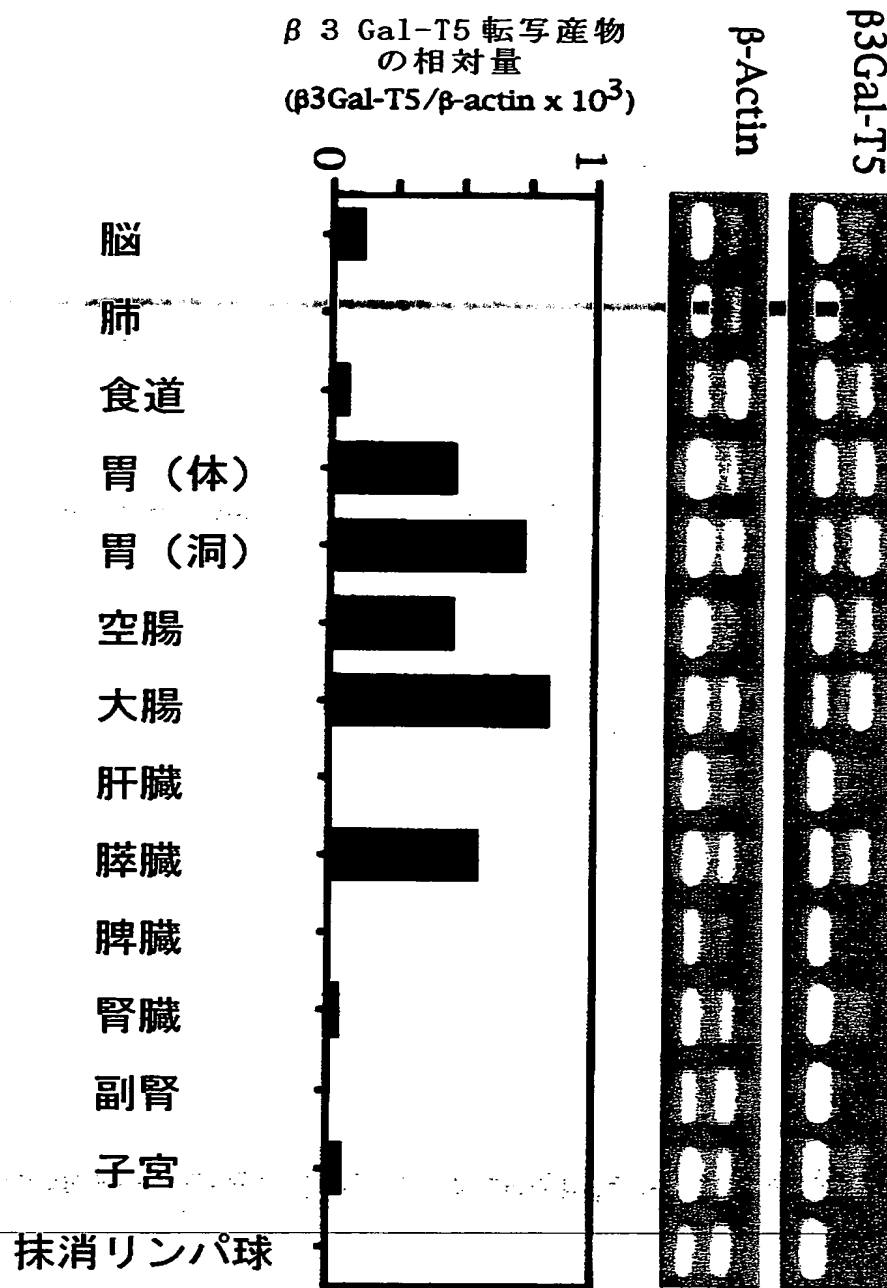
A



B



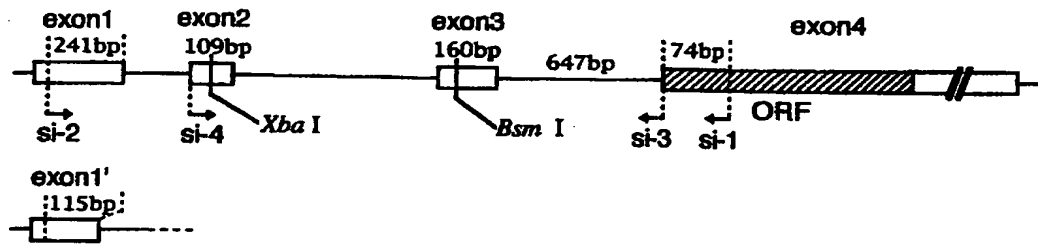
【図 5】



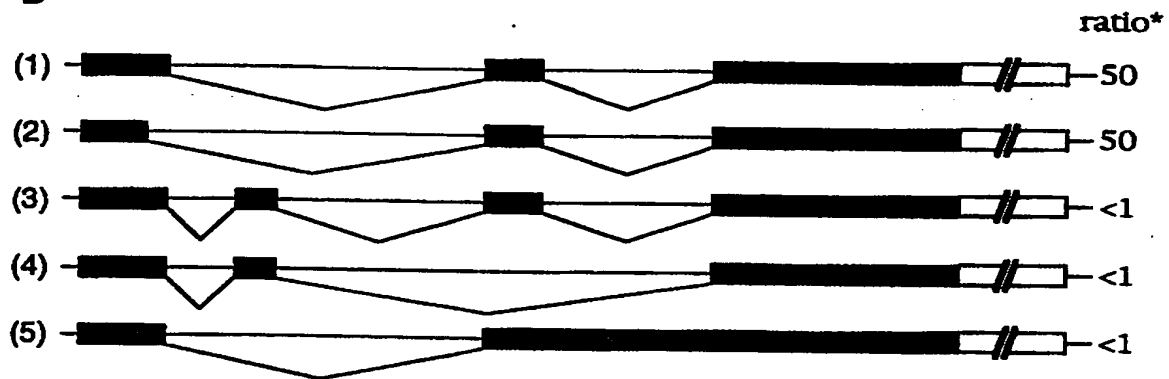


【図 6】

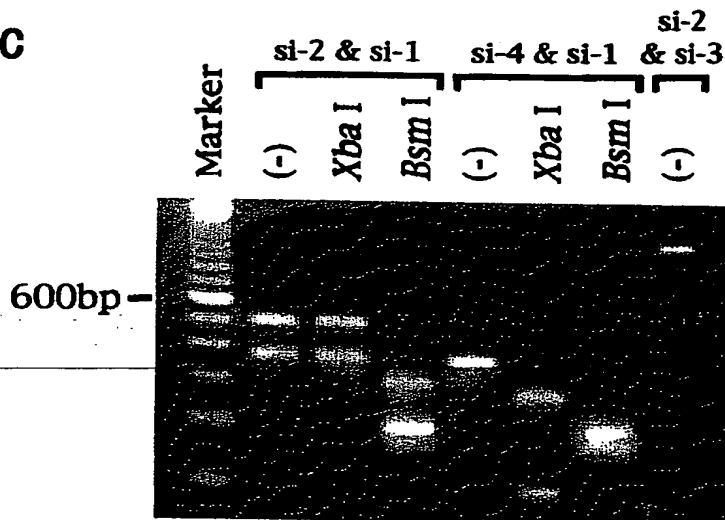
A



B



C



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素を利用し、抗炎症、抗感染症、または癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の改善法、および癌等の疾患の診断法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、タイプ 1 糖鎖の合成に関与する $\beta$  1, 3 - ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含有する組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドまたは該形質転換体を用いた該ポリペプチドまたはタイプ 1 糖鎖含有糖鎖・複合糖質の製造法、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる該ポリペプチドの検出・定量法、該ポリペプチドに関わる物質のスクリーニング法、該 DNA あるいは該抗体を用いた消化器系癌の診断法・治療法、スクリーニング法で得られた物質を用いた消化器系癌の治療法を提供することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)